



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2004137824/13, 07.04.2000

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
07.04.2000(30) Конвенционный приоритет:
24.12.1999 JP 11/368097

(43) Дата публикации заявки: 10.06.2006

(45) Опубликовано: 27.09.2009 Бюл. № 27

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: EP 0035831, 19.09.1981. EP 0037273,
07.10.1981. ЩЕЛКУНОВ С.Н.
Конструирование гибридных молекул ДНК. -
Новосибирск: Наука, 1987, стр.164.(62) Номер и дата подачи первоначальной заявки,
из которой данная заявка выделена:
2001130146 07.04.2000Адрес для переписки:
129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег. № 517

(72) Автор(ы):

ГУНДЗИ Йосия (JP),
ЯСУЕДА Хисаси (JP),
СУГИМОТО Синити (JP),
ЦУДЗИМОТО Нобухару (JP),
СИМАОКА Мегуми (JP),
МИЯТА Юри (JP),
ОБА Манами (JP)

(73) Патентообладатель(и):

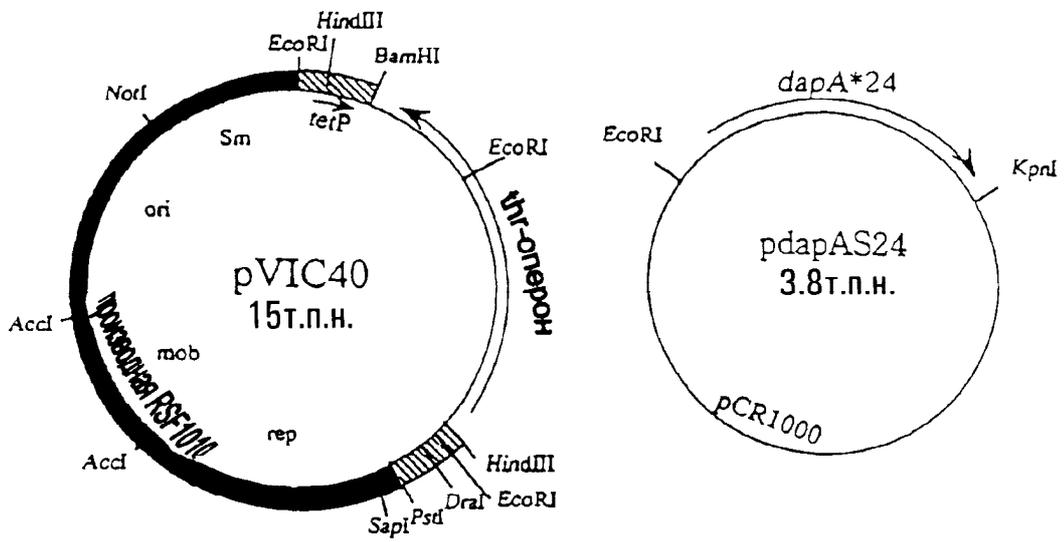
АДЗИНОМОТО КО., ИНК. (JP)

**(54) БАКТЕРИЯ, ПРОДУЦИРУЮЩАЯ L-АМИНОКИСЛОТУ, И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ
L-АМИНОКИСЛОТЫ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и представляет собой способ получения бактериальных клеток бактерии *Methylophilus* с повышенным содержанием L-аминокислоты, кроме L-глутаминовой кислоты, который включает в себя культивирование бактерии *Methylophilus*, обладающей способностью продуцировать L-аминокислоту,

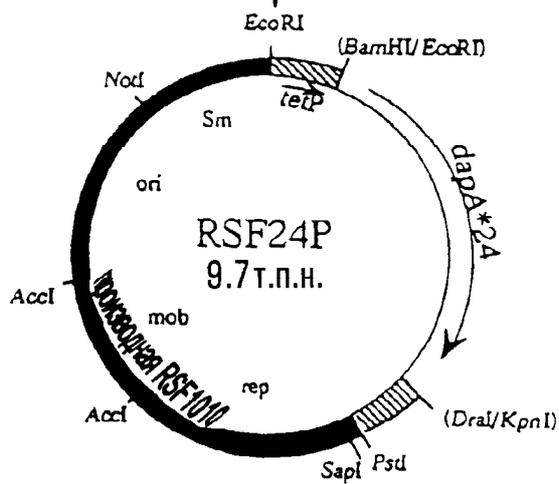
в среде для продуцирования и накопления L-аминокислоты в бактериальных клетках данной бактерии, при котором активность ферментов биосинтеза L-аминокислот у бактерии *Methylophilus* повышена. Изобретение позволяет получать бактериальные клетки с повышенным содержанием L-аминокислоты с высокой степенью эффективности. 10 з.п. ф-лы, 7 ил., 6 табл.



Переваривание *Bam*HI и *Dra*I
Обработка полимеразой T4

Переваривание *Eco*RI и *Kpn*I
Обработка полимеразой T4

Лигирование



ФИГ. 1

RU 2368659 C2

RU 2368659 C2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.
C12N 1/21 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: **2004137824/13, 07.04.2000**

(24) Effective date for property rights:
07.04.2000

(30) Priority:
24.12.1999 JP 11/368097

(43) Application published: **10.06.2006**

(45) Date of publication: **27.09.2009 Bull. 27**

(62) Number and date of filing of the initial application, from which the given application is allocated: **2001130146 07.04.2000**

Mail address:
129010, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3, OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery", pat.pov. E.E.Nazinoj, reg. № 517

(72) Inventor(s):
**GUNDZI Josija (JP),
JaSUEDA Khisasi (JP),
SUGIMOTO Siniti (JP),
TsUDZIMOTO Nobukharu (JP),
SIMAOKA Megumi (JP),
MIJaTA Juri (JP),
OBA Manami (JP)**

(73) Proprietor(s):
ADZINOMOTO KO., INK. (JP)

(54) BACTERIUM PRODUCING L-AMINO ACID, AND METHOD FOR PRODUCTION OF L-AMINO ACID

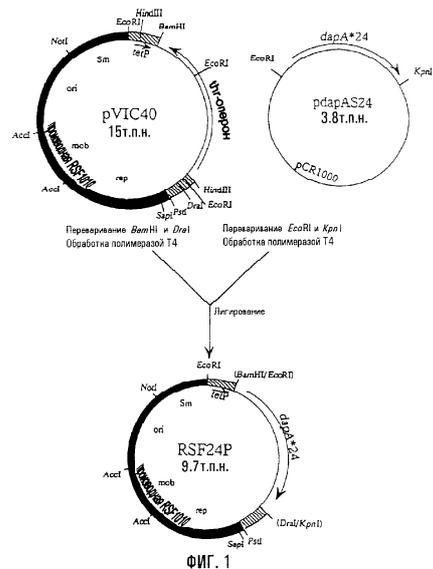
(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention represents method for production of bacterial cells of *Methylophilus* bacterium with high content of L-amino acid, apart from L-glutamine acid, which includes cultivation of *Methylophilus* bacterium, able to produce L-amino acid, in medium for production and accumulation of L-amino acid in bacterial cells of this bacterium, at which activity of ferments of L-amino acids biosynthesis in bacterium *Methylophilus* is increased.

EFFECT: production of bacterial cells with high content of L-aminoacid with high extent of efficiency.

11 cl, 7 dwg, 6 tbl, 7 ex



ФИГ. 1

RU 2 368 659 C2

RU 2 368 659 C2

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Данное изобретение имеет отношение к способам в области микробиологической промышленности. В частности, данное изобретение относится к способу производства L-аминокислоты посредством ферментации и к микроорганизму, используемому в данном способе.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Аминокислоты, такие как L-лизин, L-глутаминовая кислота, L-треонин, L-лейцин, L-изолейцин, L-валин и L-фенилаланин, получают промышленным путем посредством ферментации с использованием микроорганизмов, которые относятся к родам *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Serratia*, *Penicillium*, *Candida* и им подобным. Для того, чтобы повысить продуктивность, в качестве таких микроорганизмов использовали штаммы, выделенные в природе, или их искусственные мутанты. Были заявлены различные способы усиления активностей ферментов биосинтеза L-глутаминовой кислоты с использованием технологии рекомбинантной ДНК, чтобы повысить способность продуцировать L-глутаминовую кислоту.

Продуктивность при получении L-аминокислот была значительно повышена с помощью селекции микроорганизмов, таких как микроорганизмы, приведенные выше, и совершенствования способов производства. Однако чтобы удовлетворить дальнейшее увеличение потребностей в будущем, по-прежнему требуется развитие способов более эффективного производства L-аминокислот.

В качестве способов получения аминокислот ферментацией метанола, который представляет собой сырье для ферментации, доступное в больших количествах при низкой стоимости, имеются традиционно известные способы с использованием микроорганизмов, которые относятся к роду *Achromobacter* или *Pseudomonas* (заявка на патент Японии (Kokoku) № 45-25273/1970), *Protaminobacter* (опубликованная заявка на патент Японии (Kokai) № 49-125590/1974), *Protaminobacter* или *Methanomonas* (опубликованная заявка на патент Японии (Kokai) № 50-25790/1975), *Microcyclus* (опубликованная заявка на патент Японии (Kokai) № 52-18886/1977), *Methylobacillus* (опубликованная заявка на патент Японии (Kokai) № 4-91793/1992), *Bacillus* (опубликованная заявка на патент Японии (Kokai) № 3-505284/1991) и так далее.

Однако до настоящего времени не был известен способ получения L-аминокислот с использованием бактерий *Methylophilus*. Хотя способы, описанные в EP 0 035 831 A, EP 0 037 273 A и EP 0 066 994 A, были известны как способы трансформации бактерий *Methylophilus* с использованием рекомбинантной ДНК, применение технологии рекомбинантной ДНК для повышения продуцирования аминокислот бактериями *Methylophilus* не было известно.

РАСКРЫТИЕ СУТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Целью согласно изобретению является предоставление новой бактерии, продуцирующей L-аминокислоту, и способа получения L-аминокислоты с использованием бактерии, продуцирующей L-аминокислоту.

В результате попыток авторов изобретения, посвященных достижению упомянутой выше цели, было обнаружено, что бактерии *Methylophilus* пригодны для получения L-аминокислот. Кроме того, хотя традиционно считается, что трудно получить ауксотрофные мутанты бактерий *Methylophilus* (*FEMS Microbiology Rev.* 39, 235-258 (1986) и *Antonie van Leeuwenhoek* 53, 47-53 (1987), авторы данного изобретения достигли успеха в получении ауксотрофных мутантов указанных бактерий. Таким образом, данное изобретение было осуществлено.

То есть, данное изобретение предоставляет следующее.

(1) Бактерия *Methylophilus*, обладающая способностью продуцировать L-аминокислоту.

5 (2) Бактерия *Methylophilus* по п. (1), где L-аминокислотой является L-лизин, L-валин, L-лейцин, L-изолейцин или L-треонин.

(3) Бактерия *Methylophilus* по п. (1), которая обладает резистентностью к аналогу L-аминокислоты или аукоотрофией по L-аминокислоте.

10 (4) Бактерия *Methylophilus* по п. (1), у которой повышена активность ферментов биосинтеза L-аминокислоты.

(5) Бактерия *Methylophilus* по п. (1), у которой повышены активность дигидродипиколинатсинтазы и активность аспартокиназы, и при этом бактерия обладает способностью продуцировать L-лизин.

15 (6) Бактерия *Methylophilus* по п. (1), у которой повышена активность дигидродипиколинатсинтазы, и при этом бактерия обладает способностью продуцировать L-лизин.

(7) Бактерия *Methylophilus* по п. (1), у которой повышена активность аспартокиназы, и при этом бактерия обладает способностью продуцировать L-лизин.

20 (8) Бактерия *Methylophilus* по любому из пп. с (5) по (7), у которой активность или активности одного, двух или трех ферментов, выбранных из дегидрогеназы полуальдегида аспарагиновой кислоты, дигидродипиколинатредуктазы и диаминопимелатдекарбоксылазы, усилена/усилены.

25 (9) Бактерия *Methylophilus* по п. (5), у которой активность дигидродипиколинатсинтазы и активность аспартокиназы повышены путем трансформации посредством введения в клетки ДНК, кодирующей дигидродипиколинатсинтазу, которая не подвергается ингибированию L-лизином по принципу обратной связи, и ДНК, кодирующей аспартокиназу, которая не
30 подвергается ингибированию L-лизином по принципу обратной связи.

(10) Бактерия по п.(1), где активности аспартокиназы, гомосериндегидрогеназы, гомосеринкиназы и треонинсинтазы повышены, и бактерия обладает способностью продуцировать L-треонин.

35 (11) Бактерия по любому из пп. с (1) по (10), где бактерией *Methylophilus* является *Methylophilus methylotrophus*.

40 (12) Способ получения L-аминокислоты, который включает в себя культивирование бактерии *Methylophilus*, которая охарактеризована в лбом из указанных выше пп. с (1) по (11), в среде, чтобы продуцировать и накопить L-аминокислоту в культуре, и сбор L-аминокислоты из культуры.

(13) Способ по п. (12), при котором среда содержит метанол в качестве основного источника углерода.

45 (14) Способ получения бактериальных клеток бактерии *Methylophilus* с повышенным содержанием L-аминокислоты, который включает в себя культивирование бактерии *Methylophilus*, охарактеризованной в любом из указанных выше пунктов с (1) по (11), в среде, чтобы продуцировать и накопить L-аминокислоту в бактериальных клетках данной бактерии.

50 (15) Способ получения бактериальных клеток бактерии *Methylophilus* по п. 14, где L-аминокислотой является L-лизин, L-валин, L-лейцин, L-изолейцин или L-треонин.

(16) ДНК, которая кодирует белок, охарактеризованный в следующих пунктах (А) или (В):

(А) белок, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, или

(B) белок, который имеет аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, включая замену, делецию, инсерцию, присоединение или инверсию одной или нескольких аминокислот, и обладает активностью аспартокиназы.

5 (17) ДНК по п. (16), которая представляет собой ДНК, охарактеризованную в следующих пунктах (a) или (b):

(a) ДНК, которая имеет нуклеотидную последовательность, включающую в себя нуклеотидную последовательность от нуклеотида номер 510 до нуклеотида номер 1736 SEQ ID NO: 5; или

10 (b) ДНК, которая способна гибридизоваться с пробой, имеющей нуклеотидную последовательность от нуклеотида номер 510 до нуклеотида номер 1736 SEQ ID NO: 5 или ее часть, в жестких условиях, и кодирует белок, обладающий активностью аспартокиназы.

15 (18) ДНК, которая кодирует белок, охарактеризованный в следующих пунктах (C) или (D):

(C) белок, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, или

20 (D) белок, который имеет аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8, включая замену, делецию, инсерцию, присоединение или инверсию одной или нескольких аминокислот, и обладает активностью дегидрогеназы полуальдегида аспарагиновой кислоты.

(19) ДНК по п. (18), которая представляет собой ДНК, охарактеризованную в следующих пунктах (c) или (d):

25 (c) ДНК, которая имеет нуклеотидную последовательность, включающую в себя нуклеотидную последовательность от нуклеотида номер 98 до нуклеотида номер 1207 SEQ ID NO: 7; или

30 (d) ДНК, которая гибридизуется с пробой, имеющей нуклеотидную последовательность от нуклеотида номер 98 до нуклеотида номер 1207 SEQ ID NO: 7 или ее часть, в жестких условиях, и кодирует белок, обладающий активностью дегидрогеназы полуальдегида аспарагиновой кислоты.

(20) ДНК, которая кодирует белок, охарактеризованный в следующих пунктах (E) или (F):

35 (E) белок, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, или

(F) белок, который имеет аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10, включая замену, делецию, инсерцию, присоединение или инверсию одной или нескольких аминокислот, и обладает активностью дигидродипиколинатсинтазы.

40 (21) ДНК по п. (20), которая представляет собой ДНК, охарактеризованную в следующих пунктах (e) или (f):

(e) ДНК, которая имеет нуклеотидную последовательность, включающую в себя нуклеотидную последовательность от нуклеотида номер 1268 до нуклеотида номер 2155 SEQ ID NO: 9; или

45 (f) ДНК, которая гибридизуется с пробой, имеющей нуклеотидную последовательность от нуклеотида номер 1268 до нуклеотида номер 2155 SEQ ID NO: 9 или ее часть, в жестких условиях, и кодирует белок, обладающий активностью дигидродипиколинатсинтазы.

50 (22) ДНК, которая кодирует белок, охарактеризованный в следующих пунктах (G) или (H):

(G) белок, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, или

(H) белок, который имеет аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 12, включая замену, делецию, инсерцию, присоединение или инверсию одной или

нескольких аминокислот, и обладает активностью дигидродипиколинатредуктазы.

(23) ДНК по п. (22), которая представляет собой ДНК, охарактеризованную в следующих пунктах (g) или (h):

(g) ДНК, которая имеет нуклеотидную последовательность, включающую в себя нуклеотидную последовательность от нуклеотида номер 2080 до нуклеотида номер 2883 SEQ ID NO: 11; или

(h) ДНК, которая гибридизуется с пробой, имеющей нуклеотидную последовательность от нуклеотида номер 2080 до нуклеотида номер 2883 SEQ ID NO: 11 или ее часть, в жестких условиях, и кодирует белок, обладающий активностью дигидродипиколинатредуктазы.

(24) ДНК, которая кодирует белок, охарактеризованный в следующих пунктах (I) или (J):

(I) белок, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, или

(J) белок, который имеет аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14, включая замену, делецию, инсерцию, присоединение или инверсию одной или нескольких аминокислот, и обладает активностью диаминопимелатдекарбоксилазы.

(25) ДНК по п. (24), которая представляет собой ДНК, охарактеризованную в следующих пунктах (i) или (j):

(i) ДНК, которая имеет нуклеотидную последовательность, включающую в себя нуклеотидную последовательность от нуклеотида номер 751 до нуклеотида номер 1995 SEQ ID NO: 13; или

(j) ДНК, которая гибридизуется с пробой, имеющей нуклеотидную последовательность от нуклеотида номер 751 до нуклеотида номер 1995 SEQ ID NO: 13 или ее часть, в жестких условиях, и кодирует белок, обладающий активностью диаминопимелатдекарбоксилазы.

В данном описании «способность продуцировать L-аминокислоту» относится к способности накапливать значительное количество L-аминокислоты в среде или к увеличению содержания аминокислоты в бактериальных клетках, в том случае, когда микроорганизм согласно изобретению культивируют в среде.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фиг. 1 показан способ получения плазмиды RSF24P, имеющей мутантный *dapA*. «*dapA**24» относится к мутантному *dapA*, который кодирует мутантный фермент DDPS, в котором остаток гистидина 118 заменен остатком тирозина.

На фиг. 2 показан способ получения плазмиды RSFD80, имеющей мутантный *dapA* и мутантный *lysC*. «*lysC**80» относится к мутантному *lysC*, который кодирует мутантную АКШ, где остаток треонина 352 заменен остатком изолейцина.

На фиг. 3 показана аспартокиназная активность трансформированных штаммов *E. coli*, содержащих ген *ask*.

На фиг. 4 показана активность дегидрогеназы полуальдегида аспарагиновой кислоты трансформированных штаммов *E. coli*, содержащих ген *asd*.

На фиг. 5 показана дигидродипиколинатсинтазная активность трансформированных штаммов *E. coli*, содержащих ген *dapA*.

На фиг. 6 показана дигидродипиколинатредуктазная активность трансформированного штамма *E. coli*, содержащего ген *dapB*.

На фиг. 7 показана диаминопимелатдекарбоксилазная активность трансформированных штаммов *E. coli*, содержащих ген *lysA*.

НАИЛУЧШИЙ СПОСОБ ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

<1> Микроорганизм данного изобретения.

Микроорганизмом согласно изобретению является бактерия, относящаяся к роду *Methylophilus* и обладающая способностью продуцировать L-аминокислоту. Бактерия *Methylophilus* согласно изобретению включает в себя, например, штамм *Methylophilus methylotrophus* AS1 (NCIMB10515) и так далее.

5 Штамм *Methylophilus methylotrophus* AS1 (NCIMB10515) доступен для приобретения из национальных коллекций промышленных и морских бактерий (National Collections of Industrial and Marine Bacteria) (адрес: NCIMB Lts., Torry Research Station 135, Abbey Road, Aberdeen AB9 8DG, United Kingdom).

10 L-аминокислоты, полученные согласно изобретению, включают в себя L-лизин, L-глутаминовую кислоту, L-треонин, L-валин, L-лейцин, L-изолейцин, L-триптофан, L-фенилаланин, L-тирозин и так далее. Можно получать один или большее количество типов таких аминокислот.

15 Бактерии *Methylophilus*, обладающие способностью продуцировать L-аминокислоты, могут быть получены посредством придания способности продуцировать L-аминокислоты штаммам бактерий *Methylophilus* дикого типа. Чтобы придать способность продуцировать L-аминокислоты, могут быть использованы способы, традиционно принятые в селекции коринеформных бактерий, бактерий *Escherichia* и им подобных, такие как способы получения ауксотрофных мутантных штаммов, штаммов, резистентных к аналогам L-аминокислот, или мутантных штаммов в отношении контроля метаболических процессов, и способы получения рекомбинантных штаммов, в которых повышены активности ферментов биосинтеза L-аминокислот (смотри "Amino Acid Fermentation" the Japan Scientific Societies Press [Gakkai Shuppan Center], 1st Edition, опубликованная 30 мая, 1986, pp. 77-100). При селекции бактерий, продуцирующих аминокислоты, такие характеристики, как ауксотрофия, резистентность к аналогу L-аминокислоты и мутация метаболического контроля, можно придать бактериям отдельно или в комбинации из 20 двух или большего количества характеристик. Активность ферментов биосинтеза L-аминокислот может быть усилена для каждого в отдельности или для комбинации одного или большего количества ферментов. Кроме того, придание таких характеристик, как ауксотрофия, резистентность к аналогу L-аминокислоты и мутация метаболического контроля, можно комбинировать с усилением активности ферментов биосинтеза L-аминокислот.

25 Например, бактерии, продуцирующие L-лизин, получены при селекции как мутанты, проявляющие ауксотрофию по L-гомосерину или L-треонину и L-метионину (заявка на патент Японии (Kokoku) № 48-28078/1973 и 56-6499/1981), мутанты, проявляющие ауксотрофию по инозиту или уксусной кислоте (опубликованная заявка на патент Японии (Kokai) № 55-9784/1980 и 56-8692/1981), или мутанты, которые устойчивы к оксализину, лизингидроксамату, S-(2-аминоэтил)цистеину, γ -метиллизину, α -хлоркапролактаму, DL- α -амино- ϵ -капролактаму, α -аминолауриллактаму, аналогу аспарагиновой кислоты, сульфамидному лекарственному препарату, хиноиду или N-лауроиллейцину.

40 Кроме того, бактерии, продуцирующие L-глутаминовую кислоту, могут быть получены при селекции как мутанты, проявляющие ауксотрофию по олеиновой кислоте или ей подобному. Бактерии, продуцирующие L-треонин, могут быть получены при селекции как мутанты, устойчивые к α -амино- β -гидроксивалериановой кислоте. Бактерии, продуцирующие L-гомосерин, могут быть получены при селекции как мутанты, проявляющие ауксотрофию по L-треонину, или мутанты, устойчивые к аналогам L-фенилаланина. Бактерии, продуцирующие L-фенилаланин, могут быть

получены при селекции как мутанты, проявляющие ауксотрофию по L-тироzinу. Бактерии, продуцирующие L-изолейцин, могут быть получены при селекции как мутанты, проявляющие ауксотрофию по L-лейцину. Бактерии, продуцирующие L-пролин, могут быть получены при селекции как мутанты, проявляющие ауксотрофию по L-изолейцину.

Более того, как указано в примерах далее, штаммы, которые продуцируют один или большее количество видов разветвленных аминокислот (L-валин, L-лейцин и L-изолейцин), могут быть получены как штаммы, проявляющие ауксотрофию по казаминовой кислоте.

Чтобы получить мутанты бактерий *Methylophilus*, авторы изобретения сначала изучили детали оптимальных условий мутагенеза с использованием в качестве показателя частоты появления штаммов, резистентных к стрептомицину. В результате максимальная частота появления резистентных к стрептомицину штаммов была получена в том случае, когда степень выживаемости после мутагенеза составляла примерно 0,5%, и авторы достигли цели в получении ауксотрофных штаммов при данных условиях. Авторы также достигли успеха в получении ауксотрофных штаммов, получить которые считалось трудным, посредством значительного увеличения масштаба скрининга мутантов по сравнению с проводимым ранее для *E. coli*, и так далее.

Как описано выше, поскольку было обнаружено, что мутанты можно получить путем мутагенеза бактерий *Methylophilus* в соответствующих условиях, стало возможным легко получать желаемые мутанты, выбирая такие подходящие условия, при которых степень выживаемости после мутагенеза должна соответствовать примерно 0,5%, в зависимости от способа мутагенеза.

Способы мутагенеза для получения мутантов бактерий *Methylophilus* включают в себя УФ-облучение и обработку мутагенными средствами, используемыми при обычных мутагенных обработках, такими как N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин (NTG) и азотистая кислота. Бактерии *Methylophilus*, обладающие способностью продуцировать L-аминокислоты, также можно получить путем селекции мутантов бактерий *Methylophilus* природного происхождения.

Мутанты, устойчивые к аналогам L-аминокислот, можно получить, например, инокулируя мутантные бактерии *Methylophilus* на агаризованную среду, содержащую аналог L-аминокислоты в различных концентрациях, и отбирая штаммы, которые формируют колонии.

Ауксотрофные мутанты можно получить, давая возможность бактериям *Methylophilus* формировать колонии на агаризованной среде, содержащей целевое питательное вещество (например, L-аминокислоту), получением реплик колоний на агаризованной среде, не содержащей указанного питательного вещества, и отбором штаммов, которые не могут расти на агаризованной среде, не содержащей питательного вещества.

Способы придания или усиления способности продуцировать L-аминокислоты посредством повышения активности ферментов биосинтеза L-аминокислот будут показаны на примерах ниже.

[L-лизин]

Способность продуцировать L-лизин можно придать, например, усиливая активность дигидродипиколинатсинтазы и/или активность аспартокиназы.

Активность дигидродипиколинатсинтазы и/или активность аспартокиназы

бактерий *Methylophilus* можно повысить путем лигирования фрагмента гена, кодирующего дигидродипиколинатсинтазу, и/или фрагмента гена, кодирующего аспартокиназу, с вектором, который функционирует в бактериях *Methylophilus*, предпочтительно с вектором мультикопийного типа, чтобы создать рекомбинантную ДНК, и введением его в бактерию-хозяина *Methylophilus*, чтобы трансформировать хозяина. В результате увеличения числа копий гена, кодирующего дигидродипиколинатсинтазу, и/или гена, кодирующего аспартокиназу, в клетках трансформированного штамма активность или активности ферментов повысятся. Далее дигидродипиколинатсинтаза, аспартокиназа и аспартокиназа III также обозначаются сокращениями DDPS, АК и АКIII, соответственно.

В качестве микроорганизма, предоставляющего ген, который кодирует DDPS, и ген, который кодирует АК, могут быть использованы любые микроорганизмы, при условии, что они имеют гены, обеспечивающие экспрессию активности DDPS и активности АК у микроорганизмов, относящихся к роду *Methylophilus*. Такими микроорганизмами могут быть штаммы дикого типа или полученные от них мутантные штаммы. В частности, примеры таких микроорганизмов включают в себя штамм K-12 *E. coli* (*Escherichia coli*), штамм AS1 *Methylophilus methylotrophus* (NCIMB10515) и так далее. Так как найдены нуклеотидные последовательности обоих генов - гена, кодирующего DDPS (*dapA*, Richaud, F. et al., *J. Bacteriol.*, 297, (1986)), и гена, кодирующего АКIII (*lysC*, Cassan, M., Parsot, C., Cohen, G.N. and Patte, J.C., *J. Biol. Chem.*, 261, 1052 (1986)), полученных от бактерии *Escherichia*, указанные гены могут быть получены ПЦР с использованием праймеров, синтезированных на основе нуклеотидных последовательностей этих генов, и хромосомной ДНК такого микроорганизма как *E. coli* K-12 или ему подобного, в качестве матрицы. В качестве конкретных примеров ниже будут даны пояснения относительно *dapA* и *lysC*, полученных из *E. coli*. Однако гены, используемые в данном изобретении, не ограничены указанными выше генами.

Предпочтительно, чтобы DDPS и АК, используемые согласно изобретению, не претерпевали ингибирования L-лизином по принципу обратной связи. Известно, что DDPS дикого типа, полученная из *E. coli*, претерпевает ингибирование L-лизином по принципу обратной связи, и что АКIII дикого типа, полученная из *E. coli*, претерпевает супрессию и ингибирование по принципу обратной связи L-лизином. Поэтому *dapA* и *lysC*, вводимые в бактерии *Methylophilus*, предпочтительно кодируют DDPS и АКIII, имеющие мутацию, которая десенсибилизирует к ингибированию L-лизином по принципу обратной связи. В дальнейшем DDPS, имеющая мутацию, которая десенсибилизирует к ингибированию L-лизином по принципу обратной связи, также называется «мутантной DDPS», и ДНК, кодирующая мутантную DDPS, также именуется «мутантным *dapA*». АКIII, полученная из *E. coli*, имеющая мутацию, которая десенсибилизирует к ингибированию L-лизином по принципу обратной связи, также называется «мутантной АКIII», и ДНК, кодирующая мутантную АКIII, также именуется «мутантным *lysC*».

Согласно данному изобретению, необязательно необходимо, чтобы DDPS и АК были мутантными. Известно, например, что DDPS, полученная из бактерий *Corynebacterium*, не подвергается ингибированию L-лизином по принципу обратной связи.

Нуклеотидная последовательность *dapA* дикого типа, полученного из *E. coli*, приведена в SEQ ID NO: 1. Аминокислотная последовательность DDPS дикого типа, кодируемая указанной нуклеотидной последовательностью, иллюстрируется SEQ ID

NO: 2. Нуклеотидная последовательность *lysC* дикого типа, полученного из *E. coli*, иллюстрируется SEQ ID NO: 3. Аминокислотная последовательность АТШ дикого типа, кодируемая указанной нуклеотидной последовательностью, иллюстрируется SEQ ID NO: 4.

5 ДНК, кодирующая мутантную DDPS, которая не подвергается ингибированию по принципу обратной связи L-лизином, включает в себя ДНК, кодирующую DDPS, которая имеет аминокислотную последовательность, описанную в SEQ ID NO: 2, где остаток гистидина 118 заменен остатком тирозина. ДНК, кодирующая
10 мутантную АКШ, которая не подвергается ингибированию по принципу обратной связи L-лизином, включает в себя ДНК, кодирующую АКШ, которая имеет аминокислотную последовательность, описанную в SEQ ID NO: 4, где остаток треонина 352 заменен остатком изолейцина.

15 Плазмидой, используемой для клонирования гена, может быть любая плазида, при условии, что она может реплицироваться в микроорганизме, таком как бактерии *Escherichia* и им подобные, и в частности, включая pBR322, pTWV228, pMW119, pUC19, и так далее.

20 Вектором, который функционирует в бактериях *Methylophilus*, является, например, плазида, которая может автономно реплицироваться в бактериях *Methylophilus*. В частности, можно упомянуть RSF1010, который представляет собой вектор широкого спектра хозяев, и его производные, например, pAYC32 (Chistorerdov, A.Y., Tsygankov, Y.D. Plasmid, 16, 161-167, (1986)), pMFY42 (Gene, 44, 53, (1990)), pRP301, pTB70 (Nature, 287, 396, (1980)) и так далее.

25 Чтобы приготовить рекомбинантную ДНК лигированием *dapA* и *lysC* с вектором, который функционирует в бактериях *Methylophilus*, вектор переваривают ферментом рестрикции, который соответствует концу фрагмента ДНК, содержащего *dapA* и *lysC*. Лигирование обычно выполняют с использованием лигазы, такой как ДНК-лигаза
30 T4. *dapA* и *lysC* могут быть индивидуально включены в отдельные векторы или в один вектор.

В качестве плазмиды, содержащей мутантный *dapA*, кодирующий мутантную DDPS, и мутантный *lysC*, кодирующий мутантную АКШ, была известна плазида RSFD80 с широким спектром хозяев (WO95/16042). Штамм JM109 *E. coli*, трансформированный
35 указанной плазмидой, назван AJ12396 и помещен на хранение в National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry (почтовый индекс 305-8566, 1-3 Higashi 1-chome, Tsukubashi, Ibaraki-ken, Japan) 28 октября 1993 г. и получил инвентарный номер FERM P-13936, и перенесен для международного депонирования по условиям Будапештского
40 соглашения 1 ноября 1994 г., и получил инвентарный номер FERM BP-4859. RSFD80 можно получить из штамма AJ12396 известным способом.

Мутантный *dapA*, имеющийся в RSFD80, имеет нуклеотидную последовательность *dapA* дикого типа SEQ ID NO: 1, включая замену С в нуклеotide
45 номер 623 на Т. Поэтому кодируемая мутантная DDPS имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, включая замену остатка гистидина 118 на остаток тирозина. Мутантный *lysC*, имеющийся в RSFD80, имеет нуклеотидную последовательность *lysC* дикого типа SEQ ID NO: 3, включая замену С в нуклеotide
50 номер 1638 на Т. Поэтому кодируемая мутантная АКШ имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, включая замену остатка треонина 352 на остаток изолейцина.

Для того чтобы ввести рекомбинантную ДНК, полученную, как описано выше, в

бактерии *Methylophilus*, можно использовать любой способ, при условии, что он обеспечивает достаточную эффективность трансформации. Например, можно использовать электропорацию (*Canadian Journal of Microbiology*, 43, 197 (1997)).

5 Активность DDPS и/или активность АК также может быть повышена при наличии множественных копий *darA* и/или *lysC* в хромосомной ДНК бактерий *Methylophilus*. Чтобы ввести множественные копии *darA* и/или *lysC* в хромосомную ДНК бактерий *Methylophilus*, проводят гомологичную рекомбинацию с использованием в качестве мишени последовательности, которая представлена в хромосомной ДНК
10 бактерий *Methylophilus* множеством копий. В качестве последовательности, присутствующей в хромосомной ДНК во множестве копий, можно использовать повторяющуюся ДНК, инвертированные повторы, имеющиеся на конце транспозируемого элемента, и им подобные. В альтернативном случае, как заявлено в опубликованной заявке на патент Японии (Kokai) № 2-109985/1990, множественные
15 копии *darA* и/или *lysC* могут быть введены в хромосомную ДНК посредством их встраивания в транспозон, чтобы их перенести. В обоих способах в результате увеличенного количества копий *darA* и/или *lysC* в трансформированных штаммах активность DDPS и активность АК будут повышены.

20 Кроме указанной выше амплификации генов, активность DDPS и/или активность АК может быть повышена путем замены последовательности, контролирующей экспрессию, такой как промоторы *darA* и/или *lysC*, более сильными промоторами (опубликованная заявка на патент Японии (Kokai) № 1-215280/1989). В качестве сильных промоторов известны, например, промотор *lac*, промотор *trp*, промотор *trc*,
25 промотор *tac*, промотор P_R и промотор P_L фага лямбда, промотор *tet*, промотор *amyE*, промотор *spac* и так далее. Замещение этими промоторами усиливает экспрессию *darA* и/или *lysC*, и таким образом активность DDPS и активность АК повышаются. Усиление последовательностей, контролирующих экспрессию, можно комбинировать
30 с увеличением числа копий *darA* и/или *lysC*.

Чтобы приготовить рекомбинантную ДНК лигированием фрагмента гена и вектора, вектор переваривают ферментом рестрикции, соответствующим концу фрагмента гена. Лигирование обычно выполняют с помощью лигазы, такой как
35 ДНК-лигаза T4. В качестве способов переваривания, лигирования и других способов для ДНК, подготовки хромосомной ДНК, ПЦР, получения плазмидной ДНК, трансформации, конструирования олигонуклеотидов, используемых в качестве праймеров, и так далее, можно использовать стандартные способы, хорошо известные специалистам в данной области. Указанные способы описаны в Sambrook, J., Fritsch,
40 E. F., and Maniatis, T., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989) и так далее.

В дополнение к повышению активности DDPS и/или активности АК также может быть повышена активность другого фермента, вовлеченного в биосинтез L-лизина. К
45 таким ферментам относятся ферменты пути метаболизма диаминопимелата, такие как дигидродипиколинатредуктаза, диаминопимелатдекарбоксилаза, диаминопимелатдегидрогеназа (WO96/40934 для всех вышеуказанных ферментов), фосфоенолпируваткарбоксилаза (опубликованная заявка на патент Японии (Kokai) № 60-87788/1985), аспартатаминотрансфераза (опубликованная заявка на патент
50 Японии (Kokoku) № 6-102028/1994), диаминопимелатэпимераза, дегидрогеназа полуальдегида аспарагиновой кислоты и так далее, или ферменты пути метаболизма аминокислот, такие как гомоаконитатгидратаза, и так далее. Предпочтительно повышают активность по меньшей мере одного фермента из дегидрогеназы

полуальдегида аспарагиновой кислоты, дегидродипиколинатредуктазы и диаминопимелатдекарбоксилазы.

Аспартокиназа, дегидрогеназа полуальдегида аспарагиновой кислоты, дигидродипиколинатсинтаза, дигидродипиколинатредуктаза и диаминопимелатдекарбоксилаза, полученные из *Methylophilus methylotrophus*, будут описаны далее.

Кроме того, у микроорганизмов согласно изобретению может быть снижена активность фермента, который катализирует реакцию образования другого соединения, отличного от L-лизина, посредством ответвления пути биосинтеза L-лизина, или они могут быть дефицитны по такому ферменту. Фермент, который катализирует реакцию образования не L-лизина, а другого соединения, посредством ответвления пути биосинтеза L-лизина, включает гомосериндегидрогеназу (смотри WO95/23864).

Аналогично вышеупомянутые способы повышения активности фермента, вовлеченного в биосинтез L-лизина, могут быть использованы для других аминокислот, указанных ниже.

[L-глутаминовая кислота]

Способность продуцировать L-глутаминовую кислоту можно придать бактериям *Methylophilus*, например, путем введения ДНК, которая кодирует любой из ферментов, включая глутаматдегидрогеназу (опубликованная заявка на патент Японии (Kokai) 61-268185/1986), глутаминсинтетазу, глутаматсинтазу, изоцитратдегидрогеназу (опубликованная заявка на патент Японии (Kokai) 62-166890/1987 и 63-214189/1988), аконитатгидратазу (опубликованная заявка на патент Японии (Kokai) 62-294086/1987), цитратсинтазу (опубликованная заявка на патент Японии (Kokai) 62-201585/1987 и 63-119688/1988), фосфоенолпируваткарбоксилазу (опубликованная заявка на патент Японии (Kokai) 60-87788/1985 и 62-55089/1987), пируватдегидрогеназу, пируваткиназу, фосфоенолпируватсинтазу, енолазу, фосфоглицеромутазу, фосфоглицераткиназу, глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназу, триозофосфатизомеразу, фруктозобифосфатальдолазу, фосфофруктокиназу (опубликованная заявка на патент Японии (Kokai) 63-102692/1988), глюкозофосфатизомеразу, глутамин-оксоглутаратаминотрансферазу (WO99/07853) и так далее.

Кроме того, у микроорганизмов согласно изобретению может быть снижена активность фермента, который катализирует реакцию образования другого соединения, отличного от L-глутаминовой кислоты, посредством ответвления пути биосинтеза L-глутаминовой кислоты, или они могут быть дефицитны по такому ферменту. Фермент, который катализирует реакцию образования не L-глутаминовой кислоты, а другого соединения посредством ответвления пути биосинтеза L-глутаминовой кислоты, включает в себя α -кетоглутаратдегидрогеназу (α KGDH), изоцитратлиазу, фосфатацетилтрансферазу, ацетаткиназу, синтазу ацетооксикислоты, ацетолактатсинтазу, формиатацетилтрансферазу, лактатдегидрогеназу, глутаматдекарбоксилазу, 1-пирролин-дегидрогеназу и так далее.

[L-треонин]

Способность продуцировать L-треонин можно придать или повысить, например, усиливая активности аспартокиназы, гомосериндегидрогеназы, гомосеринкиназы и треонинсинтазы. Активности указанных ферментов можно повысить, например, путем трансформации бактерий *Methylophilus* с использованием рекомбинантной плазмиды, содержащей оперон треонина (опубликованная заявка на патент

Японии (Kokai) № 55-131397/1980, 59-31691/1984 и 56-15696/1981 и опубликованная заявка на патент Японии (Kohyo) № 3-501682/1991).

Способность к продуцированию также можно придать или повысить путем амплификации или введения оперона треонина, содержащего ген, кодирующий аспартокиназу, которая десенсibiliзирована к ингибированию L-треонином по принципу обратной связи (опубликованная заявка на патент Японии (Kokoku) № 1-29559/1989), ген, кодирующий гомосериндегидрогеназу (опубликованная заявка на патент Японии (Kokai) № 60-012995/1985), или ген, кодирующий гомосеринкиназу и гомосериндегидрогеназу (опубликованная заявка на патент Японии (Kokai) № 61-195695/1986).

Кроме того, способность продуцировать L-треонин можно повысить путем введения ДНК, кодирующей мутантную фосфоенолпируваткарбоксилазу, имеющую мутацию десенсibiliзации к ингибированию аспарагиновой кислотой по принципу обратной связи.

[L-валин]

Способность продуцировать L-валин можно придать, например, путем введения в бактерии *Methylophilus* гена биосинтеза L-валина, механизм регуляции которого в значительной степени десенсibiliзирован. Также можно ввести мутацию, которая в значительной степени десенсibiliзирует механизм регуляции гена биосинтеза L-валина, который несет микроорганизм, относящийся к роду *Methylophilus*.

Примеры гена биосинтеза L-валина включают в себя, например, оперон *ilvGMEDA* *E. coli*. Треониндезаминаза, кодируемая геном *ilvA*, катализирует реакцию дезаминирования, превращающую L-треонин в 2-кетомасляную кислоту, которая является определяющим скоростью этапом биосинтеза L-изолейцина. Поэтому для того, чтобы добиться эффективного усиления реакций синтеза L-валина, предпочтительно использовать оперон, который не экспрессирует активность треониндезаминазы. Примеры оперона *ilvGMEDA*, который не экспрессирует такой треониндезаминазной активности, включают в себя оперон *ilvGMEDA*, в котором в *ilvA* введена мутация элиминирования активности треониндезаминазы, или *ilvA* нарушен, и оперон, в котором *ilvA* делетирован.

Так как оперон *ilvGMEDA* претерпевает контроль экспрессии оперона (ослабление) L-валином и/или L-изолейцином и/или L-лейцином, район, необходимый для ослабления, предпочтительно удаляют или подвергают мутации, чтобы ликвидировать чувствительность к супрессии экспрессии L-валином.

Оперон *ilvGMEDA*, который не экспрессирует треониндезаминазную активность и который лишен чувствительности к ослаблению, как описано выше, можно получить, подвергая оперон *ilvGMEDA* дикого типа мутагенной обработке или модифицируя его с помощью технологии рекомбинации генов (смотри WO96/06926).

[L-лейцин]

Способность продуцировать L-лейцин можно придать или повысить, например, введением в микроорганизм, относящийся к роду *Methylophilus*, гена биосинтеза L-лейцина, механизм регуляции которого в значительной степени десенсibiliзирован, в дополнение к указанным выше характеристикам, необходимым для продукции L-валина. Также можно ввести такую мутацию, при которой механизм регуляции гена биосинтеза L-лейцина в микроорганизме, относящемся к роду *Methylophilus*, будет в значительной степени элиминирован. Примеры указанного гена включают в себя, например, ген *leuA*, который дает фермент, ингибирование которого L-лейцином в значительной степени устранено.

[L-изолейцин]

Способность продуцировать L-изолейцин можно придать, например, введением оперона thrABC, содержащего ген thrA, кодирующий аспартокиназу I/гомосериндегидрогеназу I, полученную из E. coli, который в значительной степени десенсибилизирован к ингибированию L-треонином, и оперона ilvGMEDA, который содержит ген ilvA, кодирующий треониндезаминазу, который в значительной степени десенсибилизирован к ингибированию L-изолейцином и район которого, необходимый для ослабления, удален (опубликованная заявка на патент Японии (Kokai) № 8-47397/1996).

[Другие аминокислоты]

Биосинтез L-триптофана, L-фенилаланина, L-тирозина, L-треонина и L-изолейцина можно усилить, повышая способность бактерий *Methylophilus* продуцировать фосфоенолпируват (WO97/08333).

Способность продуцировать L-фенилаланин и L-тирозин повышали путем амплификации или введения десенсибилизированного гена хоризматмутаза-префенатдегидратазы (CM-PDT) (опубликованная заявка на патент Японии (Kokai) № 5-236947/1993 и 62-130693/1987) и десенсибилизированного гена 3-дезоксид-арабиногептулонат-7-фосфатсинтазы (DS) (опубликованная заявка на патент Японии (Kokai) № 5-236947/1993 и 61-124375/1986).

Способность продуцировать L-триптофан повышают путем амплификации или введения триптофанового оперона, содержащего ген, кодирующий десенсибилизированную антранилатсинтазу (опубликованная заявка на патент Японии (Kokai) № 57-71397/1982, 62-244382/1987 и патент США № 4371614).

В данном описании выражение «активность фермента повышена» обычно относится к тому, что внутриклеточная активность фермента выше, чем активность у штамма дикого типа, и к тому случаю, когда штамм, в котором активность фермента повышена, получают путем модификации с использованием технологии рекомбинации генов или подобным способом, при этом внутриклеточная активность фермента выше, чем активность у штамма до модификации. Выражение «активность фермента снижена» обычно относится к тому, что внутриклеточная активность фермента ниже, чем активность у штамма дикого типа, и к тому случаю, когда штамм, в котором активность фермента снижена, получают путем модификации с использованием технологии рекомбинации генов или подобным способом, при этом внутриклеточная активность фермента ниже, чем активность у штамма до модификации.

L-аминокислоты можно получить, культивируя бактерии *Methylophilus*, обладающие способностью продуцировать L-аминокислоты, полученные, как описано выше, в среде, для того, чтобы продуцировать и накопить L-аминокислоты в культуре, и собирая L-аминокислоты из культуры.

Бактериальные клетки бактерий *Methylophilus* с повышенным содержанием L-аминокислоты по сравнению со штаммами бактерий *Methylophilus* дикого типа можно получить путем культивирования бактерий *Methylophilus*, обладающих способностью продуцировать L-аминокислоты, в среде, чтобы продуцировать и накопить L-аминокислоты в бактериальных клетках бактерий.

Микроорганизмы, используемые в данном изобретении, можно культивировать способами, обычно применяемыми для культивирования микроорганизмов, обладающих свойством усваивать метанол. Средой, применяемой согласно изобретению, может быть природная или синтетическая среда, при условии, что она содержит источник углерода, источник азота, неорганические ионы и другие

органические микрокомпоненты при необходимости.

Используя метанол в качестве основного источника углерода, L-аминокислоты можно получать при низких затратах. В том случае, когда в качестве основного источника углерода используют метанол, его обычно добавляют в среду в количестве от 0,001 до 30%. В качестве источника азота используют сульфат аммония или подобное соединение, добавляя его в среду. Помимо указанных соединений обычно добавляют небольшие количества микрокомпонентов, таких как фосфат калия, фосфат натрия, сульфат магния, сульфат железа и сульфат марганца.

Культуру обычно содержат в аэробных условиях, получаемых, например, путем встряхивания или перемешивания для аэрации, при pH от 5 до 9 и температуре от 20 до 45°C, и обычно ее завершают в пределах от 24 до 120 часов.

Сбор L-аминокислот из культуры обычно можно осуществить путем комбинирования известных способов, таких как способы с использованием ионообменной смолы, осаждения и другие.

Кроме того, клетки бактерий *Methylophilus* можно отделить от среды стандартными способами отделения клеток микроорганизмов.

<2> Ген согласно данному изобретению

ДНК согласно изобретению представляет собой ген, который кодирует один из ферментов, аспартокиназу (впредь также сокращенно называемую «АК»), дегидрогеназу полуальдегида аспарагиновой кислоты (впредь также сокращенно называемую «ASD»), дигидродипиколинатсинтазу (впредь также сокращенно называемую «DDPS»), дигидродипиколинатредуктазу (впредь также сокращенно называемую «DDPR») и диаминопимелатдекарбоксилазу (впредь также сокращенно называемую «DPDC»), полученный из *Methylophilus methylotrophus*.

ДНК согласно изобретению может быть получена, например, путем трансформации мутантного штамма микроорганизма, дефицитного по АК, ASD, DDPS, DDPR или DPDC, с использованием библиотеки генов *Methylophilus methylotrophus* и отбором клона, у которого ауксотрофия компенсирована.

Библиотеку генов *Methylophilus methylotrophus* можно, например, получить следующим образом. Сначала получают суммарную хромосомную ДНК из штамма *Methylophilus methylotrophus* дикого типа, например штамма AS1 *Methylophilus methylotrophus* (NCIMB10515), методом Saito et al. (Saito, H. and Miura, K., *Biochem. Biophys. Acta* 72, 619-629, (1963)) или подобным способом, и частично переваривают подходящим ферментом рестрикции, например, *Sau3AI* или *AluI*, чтобы получить смесь различных фрагментов. Контролируя степень переваривания посредством регулирования продолжительности реакции переваривания и так далее, можно использовать широкий круг ферментов рестрикции.

Затем переваренные фрагменты хромосомной ДНК лигируют с векторной ДНК, автономно реплицирующейся в клетках *Escherichia coli*, чтобы получить рекомбинантную ДНК. В частности, ферменту рестрикции, дающему такие же концевые нуклеотидные последовательности, как последовательности, полученные с помощью фермента рестрикции, используемого при переваривании хромосомной ДНК, дают возможность действовать на векторную ДНК, чтобы полностью переварить и расщепить вектор. Затем смесь фрагментов хромосомной ДНК и переваренную и расщепленную векторную ДНК смешивают, и дают возможность лигазе, предпочтительно ДНК-лигазе T4, действовать на смесь, чтобы получить рекомбинантную ДНК.

Раствор библиотеки генов можно получить, трансформируя *Escherichia coli*,

например *Escherichia coli* штамма JM109 или ему подобного, с использованием полученной рекомбинантной ДНК, и получением рекомбинантной ДНК из культуральной жидкости трансформанта. Указанную трансформацию можно осуществить способом D.M. Morrison (*Methods in Enzymology* 68, 326 (1979)), методом обработки реципиентных клеток хлоридом кальция для того, чтобы увеличить проницаемость ДНК (Mandel, M. and Higa, A., *J. Mol. Biol.*, 53, 159 (1970)) и так далее. В упоминаемых ниже примерах использовали электропорацию.

В качестве примеров вышеупомянутого вектора могут быть названы pUC19, pUC18, pUC118, pUC119, pBR322, pHSG299, pHSG298, pHSG399, pHSG398, RSF1010, pMW119, pMW118, pMW219, pMW218, pSTV28, pSTV29 и так далее. Также можно использовать фаговые векторы. Поскольку, например, pUC118 и pUC119 содержат ген устойчивости к ампициллину, и pSTV28 и pSTV29 содержат ген устойчивости к хлорамфениколу, только трансформанты, которые несут вектор или рекомбинантную ДНК, можно вырастить с использованием среды, содержащей ампициллин или хлорамфеникол.

В качестве способа культивирования трансформантов и сбора рекомбинантной ДНК из бактериальных клеток можно назвать щелочной способ с SDS и ему подобные.

Мутантный бактериальный штамм, дефицитный по АК, ASD, DDPS, DDPР или DPDC, трансформируют, используя раствор библиотеки генов *Methylophilus methylotrophus*, полученный, как описано выше, и отбирают клоны, у которых ауксотрофия компенсирована.

Примеры мутантного бактериального штамма, дефицитного по АК, включают в себя GT3 *E. coli*, дефицитный по трем видам генов, кодирующих АК (*thrA*, *metLM*, *lysC*). Примеры мутантного бактериального штамма, дефицитного по ASD, включают в себя Hfr3000 U482 *E. coli* (штамм CGSC 5081). Примеры мутантного бактериального штамма, дефицитного по DDPS, включают в себя AT997 *E. coli* (штамм CGSC 4547). Примеры мутантного бактериального штамма, дефицитного по DDPР, включают в себя AT999 *E. coli* (штамм CGSC 4549). Примеры мутантного бактериального штамма, дефицитного по DPDC, включают в себя AT2453 *E. coli* (штамм CGSC 4505). Указанные мутантные штаммы можно получить из Центра культур *E. coli* Genetic Stock Center (the Yale University, Department of Biology, Osborn Memorial Labs., P.O. Box 6666, New Haven 06511-7444, Connecticut, U.S.).

Хотя все вышеупомянутые мутантные штаммы не могут расти на минимальной среде M9, трансформированные штаммы, которые содержат ген, кодирующий АК, ASD, DDPS, DDPР или DPDC, могут расти на минимальной среде M9, так как в трансформантах функционируют указанные гены. Поэтому отбирая трансформированные штаммы, которые могут расти на минимальной среде, и получая рекомбинантную ДНК из этих штаммов, можно получить фрагменты ДНК, содержащие ген, который кодирует каждый фермент. AT999 *E. coli* (штамм CGSC 4549)

проявляет чрезвычайно низкую скорость роста даже в полной среде, такой как среда L, в том случае, когда диаминопимелиновая кислота не добавлена в среду. Однако нормальный рост можно наблюдать для трансформированных штаммов этих бактерий, которые содержат ген, кодирующий DDPР *Methylophilus methylotrophus*, благодаря функционированию гена. Поэтому трансформированный штамм, который содержит ген, кодирующий DDPР, также можно получить путем отбора трансформированного штамма, нормально растущего на среде L.

Выделив встроенный фрагмент ДНК из полученной рекомбинантной ДНК и

определив его нуклеотидную последовательность, можно определить аминокислотную последовательность каждого фермента и нуклеотидную последовательность кодирующего его гена.

5 Ген, кодирующий АК согласно изобретению (впредь также сокращенно называемый «ask»), кодирует АК, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, указанную в списке последовательностей. В качестве конкретного примера гена ask можно указать ДНК, имеющую нуклеотидную последовательность, которая состоит из нуклеотидов SEQ ID NO: 5. Ген ask согласно 10 данному изобретению может иметь последовательность, в которой кодон, соответствующий каждой из аминокислот, заменен эквивалентным кодоном, при условии, что он кодирует такую же аминокислотную последовательность, как аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 6.

15 Ген, который кодирует ASD согласно изобретению (впредь также сокращенно называемый “asd”), кодирует ASD, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, указанную в списке последовательностей. В качестве конкретного примера гена asd можно указать ДНК, которая содержит нуклеотидную последовательность, состоящую из нуклеотидов с номерами 20 нуклеотидов 98-1207 в SEQ ID NO: 7. Ген asd согласно изобретению может иметь последовательность, в которой кодон, соответствующий каждой из аминокислот, заменен эквивалентным кодоном, при условии, что он кодирует такую же аминокислотную последовательность, как аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 8.

25 Ген, который кодирует DDPS согласно изобретению (впредь также сокращенно называемый “dapA”), кодирует DDPS, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, указанную в списке последовательностей. В качестве конкретного примера гена dapA можно указать ДНК, которая имеет 30 нуклеотидную последовательность, состоящую из нуклеотидов с номерами нуклеотидов 1268-2155 в SEQ ID NO: 9. Ген dapA согласно изобретению может иметь последовательность, в которой кодон, соответствующий каждой из аминокислот, заменен эквивалентным кодоном, при условии, что он кодирует такую же аминокислотную последовательность, как аминокислотная последовательность SEQ 35 ID NO: 10.

Ген, который кодирует DDPR согласно изобретению (впредь также сокращенно называемый “dapB”), кодирует DDPR, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, указанную в списке последовательностей. В 40 качестве конкретного примера гена dapB можно указать ДНК, которая имеет нуклеотидную последовательность, состоящую из нуклеотидов с номерами нуклеотидов 2080-2883 в SEQ ID NO: 11. Ген dapB согласно изобретению может иметь последовательность, в которой кодон, соответствующий каждой из аминокислот, заменен эквивалентным кодоном, при условии, что он кодирует такую же 45 аминокислотную последовательность, как аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 12.

Ген, который кодирует DPDC согласно изобретению (впредь также сокращенно называемый “lysA”), кодирует DPDC, которая имеет аминокислотную 50 последовательность SEQ ID NO: 14, указанную в списке последовательностей. В качестве конкретного примера гена lysA можно указать ДНК, которая содержит нуклеотидную последовательность, состоящую из нуклеотидов с номерами нуклеотидов 751-1995 в SEQ ID NO: 13. Ген lysA согласно изобретению может иметь

последовательность, в которой кодон, соответствующий каждой из аминокислот, заменен эквивалентным кодоном, при условии, что он кодирует такую же аминокислотную последовательность, как аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 14.

5 Ген любого фермента согласно изобретению может иметь аминокислотную последовательность, соответствующую любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12 или 14, включая замену, делецию, инсерцию, присоединение или инверсию одной или нескольких аминокислот, и может
10 кодировать белок, обладающий активностью АК, ASD, DDPS, DDPR или DPDC. Используемое здесь выражение «одна или несколько» предпочтительно означает количество от 1 до 10, более предпочтительно - количество от 1 до 5, более предпочтительно - количество от 1 до 2.

15 ДНК, которая кодирует по существу такой же белок, как АК, ASD, DDPS, DDPR или DPDC, как те, которые указаны выше, можно получить, модифицируя каждую нуклеотидную последовательность так, чтобы аминокислотная последовательность содержала замену, делецию, инсерцию, присоединение или инверсию аминокислотного остатка или остатков в конкретном сайте, например, посредством сайт-специфичного
20 мутагенеза. Такую модифицированную ДНК, которая указана выше, также можно получить путем традиционных мутагенных воздействий. Примеры мутагенных воздействий включают в себя обработку *in vitro* ДНК, кодирующей АК, ASD, DDPS, DDPR или DPDC, гидроксиламином или подобными средствами, обработку микроорганизма, такого как бактерии *Escherichia*, содержащего ген, кодирующий
25 АК, ASD, DDPS, DDPR или DPDC, УФ-излучением или мутагенными агентами, используемыми при обычных мутагенных обработках, такими как N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин (NTG) и азотистая кислота.

Вышеуказанная замена, делеция, инсерция, присоединение или инверсия
30 нуклеотидов включает в себя мутации природного происхождения (мутант или вариант), такие как мутации, наблюдаемые в зависимости от различий между видами или штаммами микроорганизмов, содержащих АК, ASD, DDPS, DDPR или DPDC и так далее.

35 ДНК, которая кодирует по существу тот же самый белок, что и АК, ASD, DDPS, DDPR или DPDC, можно получить, создав возможность для экспрессии ДНК, имеющей такую мутацию, как указано выше, в подходящей клетке, и оценивая активность АК, ASD, DDPS, DDPR или DPDC продукта экспрессии. ДНК, которая кодирует по существу тот же самый белок, что и АК, ASD, DDPS, DDPR или DPDC,
40 также можно получить посредством выделения из ДНК, кодирующих АК, ASD, DDPS, DDPR или DPDC, которые имеют мутации, или из клеток, содержащих каждую из ДНК, ДНК, способной гибридизоваться с пробой, содержащей нуклеотидную последовательность, которая включает в себя нуклеотидную последовательность из нуклеотидов с номерами 510-1736 SEQ ID NO: 5, нуклеотидную последовательность,
45 включающую в себя нуклеотидную последовательность из нуклеотидов с номерами 98-1207 SEQ ID NO: 7, нуклеотидную последовательность, включающую в себя нуклеотидную последовательность из нуклеотидов с номерами 1268-2155 SEQ ID NO: 9, нуклеотидную последовательность, включающую в себя нуклеотидную последовательность из нуклеотидов с номерами 2080-2883 SEQ ID NO: 11, или
50 нуклеотидную последовательность, включающую в себя нуклеотидную последовательность из нуклеотидов с номерами 751-1995 SEQ ID NO: 13, или часть этих нуклеотидных последовательностей, в жестких условиях, и кодирующей белок,

обладающий активностью АК, ASD, DDPS, DDPR или DPDC. В данном описании иметь нуклеотидную последовательность или ее часть означает иметь нуклеотидную последовательность или ее часть, или комплементарную ей нуклеотидную последовательность.

5 Используемый здесь термин «жесткие условия» означает условия, которые дают возможность для образования так называемого специфичного гибрида и не позволяют образоваться неспецифичному гибриду. Эти условия могут варьировать в зависимости от нуклеотидной последовательности и длины пробы. Однако это может
10 быть, например, условие, которое обеспечивает гибридизацию высокомолекулярной ДНК, такой как ДНК, имеющей гомологию 40% или выше, но не допускает гибридизацию ДНК с более низкой гомологией, чем указано выше, или условие, которое обеспечивает гибридизацию в условиях промывки для традиционной Саузерн-гибридизации, при температуре 60°C и концентрациях соли,
15 соответствующих 1 × SSC и 0,1% SDS, предпочтительно 0,1 × SSC и 0,1% SDS.

В качестве пробы также можно использовать неполную последовательность каждого гена. Такая проба может быть получена посредством ПЦР (полимеразная цепная реакция) с использованием олигонуклеотидов, полученных на основе
20 нуклеотидной последовательности каждого гена, в качестве праймеров, и фрагмента ДНК, содержащего каждый ген, в качестве матрицы. В том случае, когда в качестве пробы используют фрагмент ДНК, имеющий длину примерно 300 п.н., условия промывки при гибридизации могут быть, например, 50°C, 2 × SSC и 0,1% SDS.

25 Гены, которые гибридизуются при таких условиях, которые указаны выше, также включают в себя гены, имеющие стоп-кодон, находящийся в их последовательности, и гены, кодирующие фермент, не обладающий больше своей активностью вследствие мутации активного центра. Однако такие гены можно легко исключить посредством лигирования генов в доступный для приобретения вектор, экспрессирующий
30 активность, и измерения активности АК, ASD, DDPS, DDPR или DPDC.

Поскольку нуклеотидные последовательности генов, которые кодируют АК, ASD, DDPS, DDPR или DPDC, полученных з *Methylophilus methylotrophus*, выявлены данным изобретением, то последовательности ДНК, которые кодируют АК, ASD, DDPS, DDPR или DPDC, можно получить из библиотеки генов *Methylophilus methylotrophus* посредством гибридизации с использованием олигонуклеотидных проб,
35 полученных на основе данных последовательностей. Кроме того, последовательности ДНК, которые кодируют указанные ферменты, также можно получить путем их амплификации из хромосомной ДНК *Methylophilus methylotrophus* в ходе ПЦР с
40 использованием олигонуклеотидных праймеров, полученных на основе вышеуказанных нуклеотидных последовательностей.

Вышеупомянутые гены могут быть соответствующим образом использованы для повышения способности бактерий *Methylophilus* продуцировать L-лизин.

ПРИМЕРЫ

45 Данное изобретение далее будет описано конкретно со ссылками на следующие далее примеры.

Используемые реактивы получали из Wako Pure Chemicals или Nakarai Tesque, если не оговорено особо. Составы используемых в каждом примере сред показаны ниже.
50 pH доводили с помощью NaOH или HCl для всех сред.

(Среда L)

Бактотриптон (DIFCO)	10 г/л
Дрожжевой экстракт (DIFCO)	5 г/л

	NaCl	5 г/л
--	------	-------

[Стерилизация паром при 120°C в течение 20 минут]
(Агаризованная среда L)
5 Среда L

	Бактоагар (DIFCO)	15 г/л
--	-------------------	--------

[Стерилизация паром при 120°C в течение 20 минут]
10 (Среда SOC)

	Бактотриптон (DIFCO)	20 г/л
--	----------------------	--------

	Дрожжевой экстракт (DIFCO)	5 г/л
--	----------------------------	-------

	10 мМ NaCl	
--	------------	--

	2,5 мМ KCl	
--	------------	--

	10 мМ MgSO ₄	
--	-------------------------	--

	10 мМ MgCl ₂	
--	-------------------------	--

	20 мМ глюкоза	
--	---------------	--

20 [Компоненты, за исключением раствора магния и глюкозы, стерилизовали паром (120°C, 20 минут), затем к ним добавляли 2 М маточный раствор магния (1 М MgSO₄, 1 М MgCl₂) и 2 М раствор глюкозы, растворы которых были предварительно пропущены через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм, и смесь пропускали снова через 0,22 мкм-фильтр.]

25 (Среда 121M1)

	K ₂ HPO ₄	1,2 г/л
--	---------------------------------	---------

	KH ₂ PO ₄	0,62 г/л
--	---------------------------------	----------

	NaCl	0,1 г/л
--	------	---------

	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 г/л
--	---	---------

	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 г/л
--	--------------------------------------	---------

	CaCl ₂ ·6H ₂ O	0,05 г/л
--	--------------------------------------	----------

	FeCl ₃ ·6H ₂ O	1,0 мг/л
--	--------------------------------------	----------

	H ₃ BO ₃	10 мкг/л
--	--------------------------------	----------

	CuSO ₄ ·5H ₂ O	5 мкг/л
--	--------------------------------------	---------

	MnSO ₄ ·5H ₂ O	10 мкг/л
--	--------------------------------------	----------

	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	70 мкг/л
--	--------------------------------------	----------

	NaMoO ₄ ·2H ₂ O	10 мкг/л
--	---------------------------------------	----------

	CoCl ₂ ·6H ₂ O	5 мкг/л
--	--------------------------------------	---------

	Метанол 1% (об./об.), pH 7,0	
--	------------------------------	--

45 [Компоненты, за исключением метанола, стерилизовали паром при 121°C в течение 15 минут. После достаточного охлаждения компонентов добавляли метанол].

(Состав среды 121 для продуцирования)

	Метанол	2%
--	---------	----

	Гидрофосфат калия	0,12%
--	-------------------	-------

	Фосфат калия	0,062%
--	--------------	--------

	Гексагидрат хлорида кальция	0,005%
--	-----------------------------	--------

	Гептагидрат сульфата магния	0,02%
--	-----------------------------	-------

	Хлорид натрия	0,01%
--	---------------	-------

	Гексагидрат хлорида железа	1,0 мг/л
	Сульфат аммония	0,3%
	Пентагидрат сульфата меди	5 мкг/л
	Пентагидрат сульфата марганца	10 мкг/л
5	Дигидрат молибдата натрия	10 мкг/л
	Борная кислота	10 мкг/л
	Гептагидрат сульфата цинка	70 мкг/л
	Гексагидрат хлорида кобальта	5 мкг/л
	Карбонат кальция (Kanto Kagaku) (рН 7,0)	3%

10

(Агаризованная среда 121М1)

Среда 121М1

	Бактоагар (DIFCO)	15 г/л
--	-------------------	--------

15

[Компоненты, за исключением метанола, стерилизовали паром при 121°C в течение 15 минут. После достаточного охлаждения компонентов добавляли метанол].
(Минимальная среда М9)

20	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	16 г/л
	KH_2PO_4	3 г/л
	NaCl	0,5 г/л
	NH_4Cl	1 г/л
25	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246,48 мг/л
	Глюкоза рН 7,0	2 г/л

30

[MgSO_4 и глюкозу стерилизовали отдельно (120°C, 20 минут) и добавляли. При необходимости добавляли соответствующее количество аминокислот и витаминов].
(Минимальная агаризованная среда М9)

Минимальная среда М9

	Бактоагар (DIFCO)	15 г/л
--	-------------------	--------

35

Пример 1

Создание бактерии, продуцирующей L-лизин (1)

(1) Введение мутантного *lysC* и мутантного *dapA* в бактерию *Methylophilus*.

Мутантный *lysC* и мутантный *dapA* вводили в бактерию *Methylophilus*, используя
40 содержащую их известную плазмиду RSFD80 (смотри WO95/16042). RSFD80
представляет собой плазмиду pVIC40 (международная заявка на патент WO90/04636,
опубликованная заявка на патент Японии (Kohyo) № 3-501682/1991), полученную из
векторной плазмиды pAYC32 с широким спектром хозяев (Chistorerdov, A.Y.,
Tsygankov, Y.D., Plasmid, 16, 161-167, (1986)), которая является производной RSF1010, в
45 которой мутантный *dapA* и мутантный *lysC*, полученные из *E. coli*, локализованы в
таком порядке ниже по течению промотора (*tetP*) гена устойчивости к тетрациклину
плазмиды pVIC40, так что направления транскрипции генов по отношению к *tetP*
обычны. Мутантный *dapA* кодировал мутантную DDPS, в которой остаток
50 гистидина 118 заменили остатком тирозина. Мутантный *lysC* кодировал
мутантную АКП, в которой остаток треонина 352 заменили остатком изолейцина.

RSFD80 конструировали следующим образом. Мутантный *dapA* в плазмиде p dapAS24 лигировали с pVIC40 в положении ниже по течению промотора

гена устойчивости к тетрациклину, чтобы получить RSF24P, как показано на фиг. 1. Затем получали плазмиду RSFD80, которая имела мутантный *darA* и мутантный *lysC*, из RSF24P и pLLC*80, содержащей мутантный *lysC*, как показано на фиг. 2. То есть в то время как pVIC40 содержит треониновый оперон, указанный треониновый оперон в RSFD80 замещен фрагментом ДНК, содержащим мутантный *darA*, и фрагментом ДНК, содержащим мутантный *lysC*.

Штамм JM109 *E. coli*, трансформированный плазмидой RSFD80, назван AJ12396 и помещен на хранение в National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry (почтовый индекс 305-8566, 1-3 Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japan) 28 октября 1993 г. и получил инвентарный номер FERM P-13936, и перенесен для международного депонирования по условиям Будапештского соглашения 1 ноября 1994 г., и получил инвентарный номер FERM BP-4859.

Штамм AJ1239 *E. coli* культивировали в 30 мл среды LB, содержащей 20 мг/л стрептомицина, при 30°C в течение 12 часов, и плазмиду RSFD80 очищали из полученных клеток, используя систему для очистки ДНК Wizard® Plus Midipreps (продаваемой Promega).

Плазмиду RSFD80, полученную как описано выше, вводили в штамм AS1 *Methylophilus methylotrophus* (NCIMB10515) посредством электропорации (*Canadian Journal of Microbiology*, 43, 197 (1997)). В качестве контроля район ДНК, кодирующий треониновый оперон, делетировали из плазмиды pVIC40, используемой для получения плазмиды RSFD80, чтобы получить плазмиду pRS, содержащую только векторный район (смотри опубликованную заявку на патент Японии (Kohyo) № 3-501682/1991), и плазмиду pRS вводили в штамм AS1 таким же способом, который использовали для RSFD80.

(2) Активность АКIII бактерий *Methylophilus*, содержащих мутантный *lysC* и мутантный *darA*, полученные из *E. coli*.

Получали бесклеточные экстракты из штамма AS1 *Methylophilus methylotrophus*, содержащего плазмиду RSFD80 (также именуемого далее «AS1/RSFD80»), и штамма AS1 *Methylophilus methylotrophus*, содержащего плазмиду pRS (также именуемого далее «AS1/pRS»), и измеряли активность АК. Бесклеточные экстракты (неочищенные растворы ферментов) получали следующим образом. Каждый из штаммов AS1/RSFD80 и AS1/pRS инокулировали в среду для продуцирования 121 указанного выше состава, содержащую 20 мг/мл стрептомицина, культивировали при 37°C в течение 34 часов при встряхивании и затем удаляли карбонат кальция и собирали клетки.

Бактериальные клетки, полученные как описано выше, промывали 0,2% KCl в условиях 0°C, суспендировали в 20 mM калийфосфатном буфере (pH 7), содержащем 10 mM MgSO₄, 0,8 M (NH₄)₂SO₄ и 0,03 M β-меркаптоэтанола, и разрушали ультразвуком (0°C, 200 Вт, 10 минут). Суспензию обработанных ультразвуком клеток центрифугировали при 33000 об/мин в течение 30 минут в условиях 0°C, и отделяли надосадок. К надосадку добавляли сульфат аммония до 80% насыщения, и смесь оставляли при 0°C на 1 час, и центрифугировали. Осадок растворяли в 20 mM калийфосфатном буфере (pH 7), содержащем 10 mM MgSO₄, 0,8 M (NH₄)₂SO₄ и 0,03 M β-меркаптоэтанола.

Измерение активности АК выполняли методом Стадтмана (Stadtman, E.R., Cohen, G.N., LeBras, G., and Robichon-Szulmajster, H., *J. Biol. Chem.*, 236, 2033 (1961)). А именно, реакционный раствор приведенного ниже состава инкубировали при 30°C в течение 45

минут, и проявление окраски вызывали добавлением раствора FeCl_3 (2,8 N HCl: 0,4 мл, 12% ТХУ: 0,4 мл, 5% $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ /0,1 N HCl: 0,7 мл). Реакционный раствор центрифугировали и измеряли оптическую плотность надосадка при 540 нм.

5 Активность представляли в единицах количества гидроксамовой кислоты, полученного в 1 минуту (1 ед.=1 мкмоль/мин). Коэффициент молярной экстинкции принимали равным 600. В качестве пустого контроля использовали реакционный раствор, не содержащий аспартата калия. После того как измеряли ферментативную активность, к реакционному раствору ферментов добавляли L-лизин в различных
10 концентрациях, чтобы оценить степень ингибирования L-лизином. Результаты показаны в таблице 1.

(Состав реакционного раствора)

15	Реакционная смесь *1	0,3 мл
	Раствор гидроксилamina *2	0,2 мл
	0,1 М аспарат калия (pH 7,0)	0,2 мл
	Раствор фермента	0,1 мл
	Вода (остальное)	общий объем 1 мл

20 *1 1 М трис-HCl (pH 8,1): 9 мл, 0,3 М MgSO_4 : 0,5 мл и 0,2 М АТФ (pH 7,0): 5 мл

*2 8 М раствор гидроксилamina, нейтрализованный КОН непосредственно перед использованием

Таблица 1			
Штамм	Активность АК (удельная активность *1)	Удельная активность в присутствии 5 мМ L-лизина	Степень десенсibilизации ингибирования *2 (%)
AS1/pBS	7,93	9,07	114
AS1/RSFD80	13,36	15,33	115

30 *1 нмоль/мин/мг белка
*2 Степень сохранения активности в присутствии 5 мМ L-лизина.

Как показано в таблице 1, активность АК повышалась примерно в 1,7 раза при введении плазмиды RSFD80. Кроме того, подтвердилось, что АК, полученная из *E. coli*, которую кодировала плазида RSFD80, была полностью десенсibilизирована к
35 ингибированию L-лизином. Кроме того, было обнаружено, что АК, которая в исходном состоянии сохранялась у штамма AS1, не ингибировалась одним L-лизином. Авторы согласно изобретению обнаружили, что АК, полученная из штамма AS1, ингибировалась на 100% в том случае, когда в реакционном растворе
40 присутствовали L-лизин и L-треонин по 2 мМ каждого (совместное ингибирование).

(3) Продуцирование L-лизина бактерией *Methylophilus*, содержащей утантный *lysC* и мутантный *dapA*, полученные из *E. coli*.

Затем штамм AS1/RSFD80 и штамм AS1/pRS инокулировали в среду для продуцирования 121, содержащую 20 мг/л стрептомицина, и культивировали при 37°C
45 в течение 34 часов при встряхивании. После окончания культивирования бактериальные клетки и карбонат кальция удаляли центрифугированием, и в надосадке культуры измеряли концентрацию L-лизина в аминокислотном анализаторе (JASCO Corporation [Nihon Bunko], высокоэффективная жидкостная
50 хроматография). Результаты показаны в таблице 2.

Таблица 2	
Штамм	Продуцируемое количество гидрохлорида L-лизина (г/л)

AS1/pRS	0
AS1/RSFD80	0,3

Пример 2

5 Создание бактерии, продуцирующей L-лизин (2)

(1) Введение промоторного района *tac* в вектор с широким спектром хозяев.

Чтобы получить большое количество фермента, вовлеченного в биосинтез L-лизина (*Lys*) у *Methylophilus methylotrophus* для экспрессии гена целевого фермента, использовали промотор *tac*. Данный промотор часто используется в *E. coli*.

10 Промоторный район *tac* получали амплификацией посредством ПЦР с использованием в качестве матрицы ДНК рКК233-3 (Pharmacia), и в качестве праймеров фрагментов ДНК, имеющих нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 15 и 16, и терморезистентную ДНК-полимеразу. ПЦР выполняли с использованием
15 цикла при 94°C в течение 20 секунд, при 60°C в течение 30 секунд и при 72°C в течение 60 секунд, который повторяли 30 раз. Затем амплифицированный фрагмент ДНК собирали и обрабатывали ферментами рестрикции *EcoRI* и *PstI*. С другой стороны, вектор *pRS* с широким спектром хозяев (смотри опубликованную заявку на патент Японии (Kohyo) № 3-501682/1991) также переваривали такими же ферментами
20 рестрикции, и вышеупомянутый фрагмент ДНК, который содержал промоторный район *tac*, вводили между концами, полученными при переваривании ферментами рестрикции, чтобы сконструировать *pRS-tac*.

(2) Получение плазмиды *pRS-dapA24*, экспрессирующей ген *dapA* (ген дигидродипиколинатсинтазы), и плазмиды *pRS-lysC80*, экспрессирующей ген *lysC* (ген аспартокиназы).

Мутантный ген (*dapA*24*), кодирующий дигидродипиколинатсинтазу, ферментативная активность которой была частично десенсибилизирована по отношению к ингибированию аминокислотой *Lys* по принципу обратной связи,
30 вводили в плазмиду *pRS-tac*, которую получали способом, описанным выше в (1).

Сначала получали район гена *dapA*24* амплификацией посредством ПЦР, используя в качестве матрицы ДНК *RSFD80* (смотри пример 1), и фрагменты ДНК, имеющие нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 17 и 18, в качестве
35 праймеров. ПЦР выполняли с использованием цикла при 94°C в течение 20 секунд, при 60°C в течение 30 секунд и при 72°C в течение 90 секунд, который повторяли 30 раз. Затем фрагмент обрабатывали ферментами рестрикции *Sse8387I* и *XbaI*, чтобы получить фрагмент гена *dapA*24*, имеющий соответствующие расщепленные концы. С другой стороны, вектор *pRS-tac* также обрабатывали *Sse8387I* и частично
40 переваривали *XbaI* таким же образом, как описано выше. С этой переваренной плазмидой лигировали вышеуказанный фрагмент гена *dapA*24*, используя лигазу *T4*, чтобы получить *pRS-dapA24*.

Подобным образом ген (*lysC*80*), кодирующий аспартокиназу, ферментативная
45 активность которой была частично десенсибилизирована по отношению к ингибированию аминокислотой *Lys* по принципу обратной связи, получали посредством ПЦР, используя в качестве матрицы ДНК *RSFD80*, и фрагменты ДНК, имеющие нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 19 и 20, в качестве праймеров. ПЦР выполняли с использованием цикла при 94°C в течение 20 секунд,
50 при 60°C в течение 30 секунд и при 72°C в течение 90 секунд, который повторяли 30 раз. Затем полученный фрагмент ДНК обрабатывали ферментами рестрикции *Sse8387I*

и *SapI*. С другой стороны, вектор *pRS-tac* также обрабатывали *Sse8387I* и *SapI*. С этой переваренной плазмидой лигировали вышеуказанный фрагмент гена *lysC*80*,

используя лигазу T4, чтобы получить pRS-lysC80.

(3) Введение pRS-dapA24 или pRS-lysC80 в *Methylophilus methylotrophus* и оценка культуры.

Каждую из плазмид pRS-dapA24 и pRS-lysC80, полученных как описано выше, вводили в штамм AS1 *Methylophilus methylotrophus* (NCIMB10515) посредством электропорации, чтобы получить соответственно AS1/pRS-dapA24 и AS1/pRS-lys80. Каждый штамм инокулировали в среду для продуцирования 121, содержащую 20 мг/л стрептомицина, и культивировали при 37°C в течение 48 часов при встряхивании. В качестве контрольного штамма сходным образом также культивировали штамм AS1, несущий pRS. После завершения культивирования клетки и карбонат кальция удаляли центрифугированием, и в надосадке культуры измеряли концентрацию L-лизина в аминокислотном анализаторе (JASCO Corporation [Nihon Bunko], высокоэффективная жидкостная хроматография). Результаты показаны в таблице 3.

Штамм	Продуцируемое количество гидрохлорида L-лизина (г/л)
AS1/pRS	<0,01
AS1/pRS-lysC80	0,06
AS1/pRS-dapA24	0,13

Пример 3

Создание бактерии, продуцирующей L-лизин (3)

Штамм AS1 *Methylophilus methylotrophus* (NCIMB10515) инокулировали в среду 121M1 и культивировали при 37°C в течение 15 часов. Полученные бактериальные клетки обрабатывали NTG стандартным способом (концентрация NTG: 100 мг/л, 37°C, 5 минут), и наносили на агаризованную среду 121M1, содержащую 7 г/л S-(2-аминоэтил)цистеина (АЕС) и 3 г/л L-треонина. Клетки культивировали при 37°C от 2 до 8 дней и собирали образованные колонии, получая устойчивые к АЕС штаммы.

Указанные выше устойчивые к АЕС штаммы инокулировали в среду для продуцирования 121 и культивировали при 37°C в течение 38 часов в аэробных условиях. После окончания культивирования клетки и карбонат кальция удаляли из среды центрифугированием и в надосадке культуры измеряли концентрацию L-лизина в аминокислотном анализаторе (JASCO Corporation [Nihon Bunko], высокоэффективная жидкостная хроматография). Отобрали штамм, проявляющий повышенную способность продуцировать L-лизин по сравнению с родительским штаммом, и назвали штаммом AR-166 *Methylophilus methylotrophus*. Количества L-лизина, продуцируемые родительским штаммом (штамм AS1) и штаммом AR-166, показаны в таблице 4.

Штамм	Продуцируемое количество гидрохлорида L-лизина (г/л)
AS1	5,8
AR-166	80

Штамм AR-166 *Methylophilus methylotrophus* получил собственный номер AJ13608, и он помещен на хранение в National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry (почтовый индекс 305-8566, 1-3 Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japan) 10 июня 1999 г. и получил инвентарный номер FERM P-17416, и перенесен для международного

депонирования по условиям Будапештского соглашения 31 марта 2000 г., и получил инвентарный номер FERM BP-7112.

Пример 4

Создание бактерии, продуцирующей L-треонин.

(1) Введение плазмиды с треониновым опероном в бактерию *Methylophilus*.

Плазмиду pVIC40 (международная заявка на патент WO90/04636, опубликованная заявка на патент Японии (Kohyo) № 3-501682/1992), содержащую треониновый оперон, полученный из *E. coli*, вводили в штамм AS1 *Methylophilus methylotrophus* (NCIMB10515) посредством электропорации (*Canadian Journal of Microbiology*, 43, 197 (1997)), чтобы получить штамм AS1/pVIC40. В качестве контроля получили pRS (опубликованная заявка на патент Японии (Kohyo) №3-501682/1991), имеющую только векторный район, посредством делетирования из плазмиды pVIC40 района ДНК, кодирующего треониновый оперон, и эту плазмиду вводили в штамм AS1 таким же способом, который использовали для pVIC40, получая штамм AS1/pRS.

(2) Продуцирование L-треонина бактерией *Methylophilus*, содержащей треониновый оперон, полученный из *E. coli*.

Каждый из штаммов AS1/pVIC40 и AS1/pRS инокулировали в среду для продуцирования 121, содержащую 20 мг/л стрептомицина, 1 г/л L-валина и 1 г/л L-лейцина, и культивировали при 37°C в течение 50 часов при встряхивании. После окончания культивирования клетки и карбонат кальция удаляли центрифугированием и в надсадке культуры измеряли концентрацию L-треонина в аминокислотном анализаторе (JASCO Corporation [Nihon Bunko], высокоэффективная жидкостная хроматография). Результаты показаны в таблице 5.

Таблица 5	
Штамм	Продуцируемое количество L-треонина (мг/л)
AS1/pRS	15
AS1/pVIC40	30

Пример 5

Создание бактерии, продуцирующей аминокислоты с разветвленной цепью.

Штамм AS1 *Methylophilus methylotrophus* (NCIMB10515) инокулировали в среду 121M1 и культивировали при 37°C в течение 15 часов. Полученные бактериальные клетки обрабатывали NTG стандартным способом (концентрация NTG: 100 мг/л, 37°C, 5 минут) и наносили на агаризованную среду 121M1, содержащую 0,5% казаминовой кислоты (DIFCO). Клетки культивировали при 37°C от 2 до 8 дней и давали возможность сформировать колонии. Сформированные колонии собирали и инокулировали в агаризованную среду 121M1 и агаризованную среду 121M1, содержащую 0,5% казаминовой кислоты. Отбирали штаммы, проявляющие более хороший рост на последней среде по сравнению с первой средой, как штаммы, ауксотрофные по казаминовой кислоте. Таким образом, из 500 обработанных NTG штаммов получили 9 штаммов ауксотрофных по казаминовой кислоте с сохранением остаточного уровня экспрессии. Из указанных ауксотрофных по казаминовой кислоте штаммов получили один штамм, который накапливал в среде больше L-валина, L-лейцина и L-изолейцина по сравнению с его родительским штаммом. Указанный штамм был назван штаммом C138 *Methylophilus methylotrophus*.

Штамм C138 *Methylophilus methylotrophus* получил собственный номер AJ13609, и он помещен на хранение в National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry (почтовый

индекс 305-8566, 1-3 Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japan) 10 июня 1999 г. и получил инвентарный номер FERM P-17417, и перенесен для международного депонирования по условиям Будапештского соглашения 31 марта 2000 г., и получил инвентарный номер FERM BP-7113.

Родительский штамм (штамм AS1) и штамм C138 инокулировали в среду для продуцирования L-валина и культивировали при 37°C в течение 34 часов в аэробных условиях. После окончания культивирования клетки и карбонат кальция удаляли из среды центрифугированием и в надосадке культуры измеряли концентрации L-валина, L-лейцина и L-изолейцина в аминокислотном анализаторе (JASCO Corporation [Nihon Bunko], высокоэффективная жидкостная хроматография). Результаты показаны в таблице 6.

Таблица 6			
Штамм	L-валин (мг/л)	L-лейцин (мг/л)	L-изолейцин (мг/л)
AS1	7,5	5,0	2,7
C138	330	166	249

Пример 6

Получение библиотеки хромосомной ДНК *Methylophilus methylotrophus* штамма AS1.

(1) Получение хромосомной ДНК *Methylophilus methylotrophus* штамма AS1.

Одну платиновую петлю *Methylophilus methylotrophus* штамма AS1 (NCIMB10515) высевали в 5 мл среды 121M1 в пробирку и культивировали при 37°C в течение ночи при встряхивании. Полученный культуральный бульон инокулировали в 50 мл среды 121M1 в колбу Сакагуши объемом 500 мл в количестве 1% и культивировали при 37°C в течение ночи, встряхивая. Затем клетки собирали центрифугированием и суспендировали в 50 мл раствора TEN (раствор, содержащий 50 мМ трис-НСl (рН 8,0), 10 мМ ЭДТА и 20 мМ NaCl (рН 8,0)). Клетки собирали центрифугированием и снова суспендировали в 5 мл раствора TEN, содержащего 5 мг/мл лизоцима и 10 мкг/мл РНКазы А. Суспензию выдерживали при 37°C в течение 30 минут и затем к ней добавляли протеиназу К и лаурилсульфат натрия до конечных концентраций 10 мкг/мл и 0,5% (мас./об.), соответственно.

Суспензию выдерживали при 70°C в течение 2 часов и затем добавляли равное количество насыщенного раствора фенола (раствор фенола, насыщенный 10 мМ трис-НСl (рН 8,0)) и перемешивали. Суспензию центрифугировали и собирали надосадок. Добавляли равное количество раствора фенола/хлороформа (фенол:хлороформ:изоамиловый спирт = 25:24:1) и перемешивали, и смесь центрифугировали. Надосадок собирали и к нему добавляли равное количество раствора хлороформа (хлороформ:изоамиловый спирт = 24:1), чтобы повторить такую же процедуру экстракции. К надосадку добавляли 1/10 объема 3 М ацетата натрия (рН 4,8) и 2,5-кратный объем этанола, чтобы осадить хромосомную ДНК. Осадки собирали центрифугированием, промывали 70% этанолом, сушили при пониженном давлении и растворяли в соответствующем количестве раствора TE (10 мМ трис-НСl, 1 мМ ЭДТА (рН 8,0)).

(2) Получение библиотеки генов.

Порции хромосомной ДНК, полученной как описано выше в (1), объемом 50 мкл (1 мкг/мкл), 20 мкл буфера Н (500 мМ трис-НСl, 100 мМ MgCl₂, 10 мМ дитиотреитол, 1000 мМ NaCl (рН 7,5)) и 8 единицам фермента рестрикции Sau3AI (Takara Shuzo) давали возможность реагировать при 37°C в течение 10 минут в общем объеме 200

мкл, и затем для того, чтобы остановить реакцию, добавляли 200 мкл раствора фенола/хлороформа и перемешивали. Реакционную смесь центрифугировали и собирали верхний слой и разделяли на 0,8% агарозном геле. ДНК, соответствующую от 2 до 5 тысячам пар нуклеотидов (далее сокращенно обозначаемым «т.п.н.»), собирали, используя систему быстрой экстракции из геля Concert™ (набор для сбора ДНК, GIBCO BRL Co.). Таким образом, получили 50 мкл раствора ДНК фракционированного размера.

С другой стороны, 2,5 мкг плазмиды pUC118 (Takara Shuzo), 2 мкл буфера К (200 мМ трис-НСl, 100 мМ MgCl₂, 10 мМ дитиотреитол, 1000 мМ КСl (рН 8,5)) и 10 единиц фермента рестрикции BamHI (Takara Shuzo) давали возможность реагировать при 37°C в течение 2 часов в общем объеме 20 мкл, затем добавляли 20 единиц щелочной фосфатазы тонкого кишечника теленка (Takara Shuzo) и перемешивали, смеси давали возможность реагировать еще 30 минут. Реакционную смесь смешивали с равным количеством раствора фенола/хлороформа, и смесь центрифугировали. Собирали надосадок и к нему добавляли равное количество раствора хлороформа, чтобы повторить сходную процедуру экстракции. К надосадку добавляли 1/10 объема 3 М ацетата натрия (рН 4,8) и 2,5-кратный объем этанола, чтобы осадить ДНК. ДНК собирали центрифугированием, промывали 70% этанолом, сушили при пониженном давлении и растворяли в соответствующем количестве раствора ТЕ.

Продукт переваривания хромосомной ДНК Sau3AI, полученный как описано выше, и продукт переваривания pUC118 рестриктазой BamHI лигировали, используя набор для лигирования, вариант 2 (Takara Shuzo). К реакционной смеси добавляли 1/10 объема 3 М ацетата натрия (рН 4,8) и 2,5-кратный объем этанола, чтобы осадить ДНК. ДНК собирали центрифугированием, промывали 70% этанолом, сушили при пониженном давлении и растворяли в растворе ТЕ (раствор А для лигазы).

Таким же образом, как в описанной выше процедуре, лигировали фрагменты, полученные при частичном переваривании хромосомной ДНК ферментом рестрикции AluI (Takara Shuzo), и продукт переваривания SmaI плазмиды pSTV29 (Takara Shuzo) (раствор В для лигазы).

Одну платиновую петлю E. coli JM109 инокулировали в 5 мл среды L в пробирку и культивировали при 37°C в течение ночи, встряхивая. Полученный культуральный бульон инокулировали в 50 мл среды L в колбе Сакагуши объемом 500 мл в количестве, равном 1%, культивировали при 37°C до того, как OD₆₆₀ культуры достигала значения от 0,5 до 0,6, и охлаждали на льду в течение 15 минут. Затем клетки собирали центрифугированием при 4°C. Клетки суспендировали в 50 мл ледяной воды и центрифугировали, чтобы промыть клетки. Эту операцию повторяли снова один раз, и клетки суспендировали в 50 мл ледяного 10% раствора глицерина, и центрифугировали, чтобы промыть клетки. Клетки суспендировали в 10% растворе глицерина такого же объема, как объем клеток, и делили на аликвоты по 50 мкл. К клеткам в объеме 50 мкл добавляли 1 мкл раствора А для лигазы или раствора В для лигазы, полученных как описано выше. Затем смесь помещали в специальную кювету (с зазором 0,1 см, предварительно охлажденную на льду) для прибора для электропорации BioRad.

Параметры настройки прибора были равны 1,8 кВ и 25 мкФ, и параметры настройки системы контроля импульсов - 200 Ом. Кювету вставляли в прибор и прикладывали к ней импульсы. Сразу после воздействия импульсами в нее добавляли 1 мл ледяной среды SOC, и смесь переносили в стерильную пробирку и культивировали при 37°C в течение 1 часа, встряхивая. Бульон с каждой культурой

клеток наносили на агаризованную среду L, содержащую антибиотик (100 мкг/мл ампициллина в случае использования раствора А для лигазы или 20 мкг/мл хлорамфеникола в случае использования раствора В для лигазы), и инкубировали при 37°C в течение ночи. Колонии, появившиеся на каждой агаризованной среде, соскребали, инокулировали в 50 мл среды L, содержащей соответствующий антибиотик, в колбе Сакагуши объемом 500 мл и культивировали при 37°C в течение 2 часов, всряхивая. Плазмидную ДНК экстрагировали из каждого бульона с культурой щелочным способом с SDS, чтобы получить раствор А библиотеки генов и раствор В библиотеки генов, соответственно.

Пример 7

Клонирование гена биосинтеза лизина *Methylophilus methylotrophus* штамма AS1.

(1) Клонирование гена, кодирующего аспартокиназу (АК).

Клетки *E. coli* GT3, дефицитные по трем генам, кодирующим АК (*thrA*, *metLM* и *lysC*), трансформировали раствором В библиотеки генов посредством такой же процедуры электропорации, как указано выше. К раствору для трансформации добавляли среду SOC, содержащую 20 мкг/мл диаминопимелиновой кислоты, и культивировали при 37°C, всряхивая. Затем культуральный бульон наносили на среду L, содержащую 20 мкг/мл диаминопимелиновой кислоты и 20 мкг/мл хлорамфеникола, чтобы получить появляющиеся колонии. С полученной чашки как с основной матрицы получали реплику на агаризованной среде M9, содержащей 20 мкг/мл хлорамфеникола, и реплику инкубировали при 37°C от 2 до 3 дней. Хозяин не мог расти на минимальной среде M9, которая не содержала диаминопимелиновой кислоты, так как он не обладал активностью АК. Напротив, ожидалось, что трансформированный штамм, который содержал ген, кодирующий АК, полученный из *Methylophilus methylotrophus*, мог расти в минимальной среде M9 благодаря функционированию гена.

Два трансформанта примерно из 3000 трансформантов формировали колонии на среде M9. Из этих колоний, появившихся на среде M9, экстрагировали и анализировали плазмиды. В результате было подтверждено наличие в плазмиде встроенного фрагмента. Плазмиды были названы pMMASK-1 и pMMASK-2, соответственно. Используя указанные плазмиды, снова трансформировали *E. coli* GT3. Полученные трансформанты могли расти на минимальной среде M9. Затем трансформант, который содержал каждую из указанных плазмид, культивировали в течение ночи в среде L, содержащей 20 мкг/мл хлорамфеникола, и клетки собирали центрифугированием бульона с культурой. Бесклеточные экстракты получали, обрабатывая клетки ультразвуком, и измеряли активность АК методом Miyajima et al. (*Journal of Biochemistry* (Tokyo), vol. 63, 139-148 (1968)) (фиг. 3: pMMASK-1, pMMASK-2). Кроме того, штамм GT3, несущий вектор pSTV29, сходным образом культивировали в среде L, содержащей 20 мкг/мл диаминопимелиновой кислоты и 20 мкг/мл хлорамфеникола, и измеряли активность АК (фиг. 3: Вектор). В результате наблюдали увеличение активности АК в двух клонах, содержащих встроенные фрагменты, по сравнению с трансформантом, несущим только вектор. Поэтому было подтверждено, что ген, который удалось клонировать в pSTV29, представлял собой ген АК, полученный из *Methylophilus methylotrophus*. Указанный ген был обозначен ask.

Последовательность нуклеотидов ДНК гена ask определяли методом с использованием дидезоксинуклеотидов. Было обнаружено, что pMMASK-1 и pMMASK-2 содержали общий фрагмент. Нуклеотидная последовательность фрагмента ДНК, содержащего ген ask, полученный из *Methylophilus methylotrophus*, показана в SEQ ID

NO: 5. Аминокислотная последовательность, которую может кодировать нуклеотидная последовательность, показана в SEQ ID NO: 5 и 6.

(2) Клонирование гена, кодирующего дегидрогеназу полуальдегида аспарагиновой кислоты (ASD).

5 Клетки *E. coli* Hfr3000 U482 (штамм CGSC 5081), дефицитные по гену *asd*, трансформировали путем электропорации, используя раствор В библиотеки генов, таким же образом, как описано выше. К раствору для трансформации добавляли среду SOC, содержащую 20 мкг/мл диаминопимелиновой кислоты, и смесь
10 культивировали при 37°C, встряхивая. Клетки собирали центрифугированием. Клетки промывали, суспендируя их в среде L и центрифугируя суспензию. Такую же операцию промывки снова повторяли один раз, и клетки суспендировали в среде L. Затем суспензию распределяли на агаризованной среде L, содержащей 20 мкг/мл
15 хлорамфеникола, инкубировали в течение ночи при 37°C. Хозяин показывал чрезвычайно низкий рост на среде L, не содержащей диаминопимелиновой кислоты, так как он был дефицитен по гену *asd*. Напротив, ожидалось, что нормальный рост наблюдался бы для трансформированного штамма, который содержал ген, кодирующий ASD, полученный из *Methylophilus methylotrophus*, даже в среде L
20 благодаря функционированию гена. Кроме того, клетки хозяина *E. coli* не могли расти в минимальной среде M9, но ожидалось, что трансформированный штамм, который содержал ген, кодирующий ASD, полученный из *Methylophilus methylotrophus*, будет способен расти на минимальной среде M9 благодаря функционированию гена. Поэтому колонии трансформантов, которые нормально выросли на среде L, собрали,
25 высевали штрихом и культивировали на агаризованной среде M9. В результате наблюдали рост. Таким образом, подтвердили, что ген, кодирующий ASD, как и ожидалось, функционировал у данных трансформантов.

Из трех трансформированных штаммов, появившихся на среде M9, экстрагировали
30 плазмиды и подтвердили наличие в плаزمиде встроенного фрагмента. Плазмиды были названы pMMASD-1, pMMASD-2 и pMMASD-3, соответственно. Когда *E. coli* Hfr3000 U482 снова трансформировали, используя указанные плазмиды, каждый трансформант вырос на минимальной среде M9. Затем каждый трансформант культивировали в течение ночи в среде L, содержащей 20 мкг/мл хлорамфеникола, и
35 клетки собирали центрифугированием бульона с культурой. Клетки обрабатывали ультразвуком, получая неочищенный раствор ферментов, и измеряли активность ASD методом Boy et al. (*Journal of Bacteriology*, vol. 112 (1), 84-92 (1972)) (фиг. 4: pMMASD-1, pMMASD-2, pMMASD-3). Кроме того, в качестве контрольного
40 эксперимента клетки хозяина, несущие вектор, сходным образом культивировали в среде L, содержащей 20 мкг/мл диаминопимелиновой кислоты и 20 мкг/мл хлорамфеникола, и измеряли активность ASD (фиг. 4: Вектор). В результате ферментативная активность не выявлялась у трансформанта, несущего только вектор, в то время как активность ASD можно было определить в трех клонах, содержащих
45 встроенный фрагмент. Поэтому было подтверждено, что полученный ген представлял собой ген, кодирующий ASD, полученный из *Methylophilus methylotrophus* (обозначен *asd*).

Последовательность нуклеотидов ДНК гена *asd* определяли методом с
50 использованием дидезоксинуклеотидов. Было обнаружено, что все три полученных клона содержали общий фрагмент. Нуклеотидная последовательность фрагмента ДНК, содержащего ген *asd*, полученный из *Methylophilus methylotrophus*, показана в SEQ ID NO: 7. Аминокислотная последовательность, которую может кодировать

нуклеотидная последовательность, показана в SEQ ID NO: 7 и 8.

(3) Клонирование гена, кодирующего дигидродипиколинатсинтазу (DDPS).

Клетки *E. coli* AT997 (штамм CGSC 4547), дефицитные по гену *dapA*, трансформировали посредством такой же процедуры электропорации, используя раствор А библиотеки генов. К раствору для трансформации добавляли среду SOC, содержащую 20 мкг/мл диаминопимелиновой кислоты, и смесь культивировали при 37°C, встряхивая. Затем бульон с культурой распределяли на среде L, содержащей 20 мкг/мл диаминопимелиновой кислоты и 100 мкг/мл ампициллина, чтобы получить появляющиеся колонии. С полученной чашки как с основной матрицы получали реплику на минимальной агаризованной среде M9, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, и реплику инкубировали при 37°C от 2 до 3 дней. Хозяин не мог расти на минимальной среде M9, которая не содержала диаминопимелиновой кислоты, так как был дефицитен по гену *dapA*. Напротив, ожидалось, что трансформированный штамм, который содержал ген, кодирующий DDPS, полученный из *Methylophilus methylotrophus*, мог расти в минимальной среде M9 благодаря функционированию гена.

Из колоний двух штаммов, появившихся на среде M9, экстрагировали и анализировали плазмиды. В результате подтвердили наличие в плаزمиде встроенного фрагмента. Плазмиды были названы pMMDAPA-1 и pMMDAPA-2, соответственно. Когда *E. coli* AT997 снова трансформировали, используя указанные плазмиды, каждый трансформант вырос на минимальной среде M9. Затем каждый трансформант, содержащий каждую плазмиду, культивировали в течение ночи в среде L, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, и клетки собирали центрифугированием бульона с культурой. Клетки обрабатывали ультразвуком, получая клеточный экстракт, и измеряли активность DDPS методом Yugarı et al. (*Journal of Biological Chemistry*, vol. 240, and p. 4710 (1965)) (фиг. 5: pMMDAPA-1, pMMDAPA-2). Кроме того, в качестве контрольного эксперимента клетки хозяина, несущие вектор, сходным образом культивировали в среде L, содержащей 20 мкг/мл диаминопимелиновой кислоты и 100 мкг/мл ампициллина, и измеряли активность DDPS (фиг. 5: Вектор). В результате ферментативная активность не выявлялась у трансформанта, несущего только вектор, в то время как активность DDPS можно было определить в каждом из трансформантов, несущих плазмиды, которые содержат встроенный фрагмент. Поэтому было подтверждено, что полученный ген представлял собой ген, кодирующий DDPS, полученный из *Methylophilus methylotrophus* (обозначен *dapA*).

Последовательность нуклеотидов ДНК гена *dapA* определяли методом с использованием дидезоксинуклеотидов. Было обнаружено, что два встроенных фрагмента содержали общий фрагмент. Нуклеотидная последовательность фрагмента ДНК, содержащего ген *dapA*, полученный из *Methylophilus methylotrophus*, показана в SEQ ID NO: 9. Аминокислотная последовательность, которую может кодировать нуклеотидная последовательность, показана в SEQ ID NO: 9 и 10.

(4) Клонирование гена, кодирующего дигидродипиколинатредуктазу (DDPR).

Клетки *E. coli* AT999 (штамм CGSC 4549), дефицитные по гену *dapB*, трансформировали посредством такой же процедуры электропорации, как описано выше, используя раствор А библиотеки генов. К раствору для трансформации добавляли среду SOC, содержащую 20 мкг/мл диаминопимелиновой кислоты, и смесь культивировали при 37°C, встряхивая. Затем клетки собирали центрифугированием. Клетки промывали, суспендируя их в среде L и центрифугируя суспензию. Такую же операцию промывки снова повторяли один раз, и клетки суспендировали в среде L. Затем суспензию распределяли на агаризованной среде L, содержащей 100 мкг/мл

ампициллина, и инкубировали в течение ночи при 37°C. Хозяин показывал чрезвычайно низкий рост на среде L, не содержащей диаминопимелиновой кислоты, так как он был дефицитен по гену *dapB*. Напротив, ожидалось, что нормальный рост может наблюдаться для трансформированного штамма, который содержал ген, кодирующий DDPР, полученный из *Methylophilus methylotrophus*, даже в среде L, благодаря функционированию гена. Кроме того, клетки хозяина *E. coli* не могли расти в минимальной среде M9, но ожидалось, что трансформированный штамм, который содержал ген, кодирующий DDPР, полученный из *Methylophilus methylotrophus*, может расти на минимальной среде M9 благодаря функционированию гена.

Поэтому колонию трансформанта, который нормально вырос на среде L, соскребали и культивировали на агаризованной среде M9. В этом случае также наблюдали рост на среде M9. Таким образом, подтвердили, что ген, кодирующий DDPР, функционировал в трансформированном штамме. Из колонии, появившейся на среде M9, экстрагировали плазмиду и подтвердили наличие в плазмиде встроенного фрагмента. Когда *E. coli* AT999 снова трансформировали, используя плазмиду (pMMDAPB), трансформант вырос на минимальной среде M9. Затем трансформант, содержащий плазмиду, культивировали в течение ночи в среде L, и клетки собирали центрифугированием бульона с культурой. Клетки обрабатывали ультразвуком, получая клеточный экстракт, и измеряли активность DDPР методом Tamir et al. (*Journal of Biological Chemistry*, vol. 249, p. 3034 (1974)) (фиг. 6: pMMDAPB). Кроме того, в качестве контрольного эксперимента клетки хозяина, несущие вектор, сходным образом культивировали в среде L, содержащей 20 мкг/мл диаминопимелиновой кислоты и 100 мкг/мл ампициллина, и измеряли активность DDPР (фиг. 6: Вектор). В результате ферментативная активность не выявлялась у трансформанта, несущего только вектор, в то время как активность DDPР можно было определить у трансформанта, несущего pMMDAPB. Поэтому было подтверждено, что полученный ген представлял собой ген, кодирующий DDPР, полученный из *Methylophilus methylotrophus* (обозначен *dapB*).

Последовательность нуклеотидов ДНК гена *dapB* определяли методом с использованием дидезоксинуклеотидов. Нуклеотидная последовательность фрагмента ДНК, содержащего ген *dapB*, полученный из *Methylophilus methylotrophus*, показана в SEQ ID NO: 11. Аминокислотная последовательность, которую может кодировать нуклеотидная последовательность, показана в SEQ ID NO: 11 и 12.

(5) Клонирование гена, кодирующего диаминопимелатдекарбоксилазу (DPDC).

Клетки *E. coli* AT2453 (штамм CGSC 4505), дефицитные по гену *lysA*, трансформировали посредством такой же процедуры электропорации, как описано выше, используя раствор А библиотеки генов. К раствору для трансформации добавляли среду SOC, и смесь культивировали при 37°C, встряхивая. Клетки собирали центрифугированием. Клетки промывали, суспендируя их в 5 мл стерильной воды и центрифугируя суспензию. Такую же операцию промывки снова повторяли один раз, и клетки суспендировали в 500 мкл стерильной воды. Затем суспензию распределяли на агаризованной минимальной среде M9, содержащей 20 мкг/мл хлорамфеникола, и инкубировали при 37°C от 2 до 3 дней. Хозяин не мог расти на минимальной среде M9, не содержащей лизина, так как он был дефицитен по гену *lysA*. Напротив, ожидалось, что трансформированный штамм, который содержал ген, кодирующий DPDC, полученный из *Methylophilus methylotrophus*, может расти в минимальной среде M9 благодаря функционированию гена.

Поэтому из трех трансформированных штаммов, появившихся на среде M9,

экстрагировали и анализировали плазмиды. В результате подтвердили наличие в плаزمидах встроенного фрагмента. Плазмиды были названы pMMLYSA-1, pMMLYSA-2 и pMMLYSA-3, соответственно. Когда *E. coli* AT2453 снова трансформировали, используя каждую из указанных плазмид, каждый трансформант вырастал на минимальной среде M9. Затем каждый трансформант, содержащий каждую из плазмид, культивировали в течение ночи в среде L, содержащей 20 мкг/мл хлорамфеникола, и клетки собирали центрифугированием бульона с культурой. Клетки обрабатывали ультразвуком, получая клеточный экстракт, и измеряли активность DPDC методом Cremer et al. (*Journal of General Microbiology*, vol. 134, 3221-3229 (1988)) (фиг. 7: pMMLYSA-1, pMMLYSA-2, pMMLYSA-3). Кроме того, в качестве контрольного эксперимента клетки хозяина, несущие вектор, сходным образом культивировали в среде L, содержащей 20 мкг/мл хлорамфеникола, и измеряли активность DPDC (фиг. 7: Вектор). В результате ферментативная активность не выявлялась у трансформанта, несущего только вектор, в то время как активность DPDC можно было определить в трех клонах, имеющих встроенный фрагмент. Поэтому было подтверждено, что полученный ген представлял собой ген, кодирующий DPDC, полученный из *Methylophilus methylotrophus* (обозначен *lysA*).

Последовательность нуклеотидов ДНК гена *lysA* определяли методом с использованием дидезоксинуклеотидов. Обнаружено, что все три встроенных фрагмента содержали общий фрагмент ДНК. Нуклеотидная последовательность фрагмента ДНК, содержащего ген *lysA*, полученный из *Methylophilus methylotrophus*, показана в SEQ ID NO: 13. Аминокислотная последовательность, которую может кодировать нуклеотидная последовательность, показана в SEQ ID NO: 13 и 14.

Промышленное применение

Согласно данному изобретению предоставлены бактерия *Methylophilus*, обладающая способностью продуцировать L-аминокислоту, способ получения L-аминокислоты с использованием бактерии *Methylophilus* и бактериальные клетки *Methylophilus* с повышенным содержанием L-аминокислоты. Способом согласно изобретению предоставляется возможность получать L-аминокислоту, используя метанол в качестве сырья. Кроме того, данное изобретение предоставляет новые гены ферментов биосинтеза L-лизина, полученные из бактерий *Methylophilus*.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Ajinomoto Co., Inc.

5

<120> БАКТЕРИЯ, ПРОДУЦИРУЮЩАЯ L-АМИНОКИСЛОТУ, И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ L-АМИНОКИСЛОТЫ
ACID

10

<130> В-591MSOP975

<150> JP 11-103143

<151> 1999-04-09

15

<150> JP 11-169447

<151> 1999-06-16

20

<150> JP 11-368097

<151> 1999-12-24

<160> 20

25

<170> Патент, версия 2.0

<210> 1

<211> 1197

<212> ДНК

30

<213> Escherichia coli

<220>

<221> Кодирующая последовательность

35

<222> (272)..(1147)

<400> 1

40

ccagggcact gtcttcaata ttacagccgc aactactgac atgacgggtg atggtgttca 60
caattccaag gcgatcggca cccaacgcag tgatcaccag ataatgtgtt gcgatgacag 120
tgtcaaaactg gttattcctt taaggggtga gttgttctta aggaaagcat aaaaaaaca 180
tgcatacaac aatcagaacg gttctgtctg cttgctttta atgccatacc aaacgtacca 240
ttgagacaact tgtttgacaca gaggatggcc c atg ttc acg gga agt att gtc 292
Met Phe Thr Gly Ser Ile Val

45

50

	1					5											
	gcg	att	gtt	act	ccg	atg	gat	gaa	aaa	ggt	aat	gtc	tgt	cgg	gct	agc	340
	Ala	Ile	Val	Thr	Pro	Met	Asp	Glu	Lys	Gly	Asn	Val	Cys	Arg	Ala	Ser	
			10					15					20				
5	ttg	aaa	aaa	ctg	att	gat	tat	cat	gtc	gcc	agc	ggt	act	tcg	gcg	atc	388
	Leu	Lys	Lys	Leu	Ile	Asp	Tyr	His	Val	Ala	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ile	
		25					30					35					
10	gtt	tct	gtt	ggc	acc	act	ggc	gag	tcc	gct	acc	tta	aat	cat	gac	gaa	436
	Val	Ser	Val	Gly	Thr	Thr	Gly	Glu	Ser	Ala	Thr	Leu	Asn	His	Asp	Glu	
		40				45				50					55		
	cat	gct	gat	gtg	gtg	atg	atg	acg	ctg	gat	ctg	gct	gat	ggg	cgc	att	484
15	His	Ala	Asp	Val	Val	Met	Met	Thr	Leu	Asp	Leu	Ala	Asp	Gly	Arg	Ile	
				60					65					70			
	ccg	gta	att	gcc	ggg	acc	ggc	gct	aac	gct	act	gcg	gaa	gcc	att	agc	532
	Pro	Val	Ile	Ala	Gly	Thr	Gly	Ala	Asn	Ala	Thr	Ala	Glu	Ala	Ile	Ser	
			75					80					85				
20	ctg	acg	cag	cgc	ttc	aat	gac	agt	ggt	atc	gtc	ggc	tgc	ctg	acg	gta	580
	Leu	Thr	Gln	Arg	Phe	Asn	Asp	Ser	Gly	Ile	Val	Gly	Cys	Leu	Thr	Val	
			90				95					100					
25	acc	cct	tac	tac	aat	cgt	ccg	tcg	caa	gaa	ggt	ttg	tat	cag	cat	ttc	628
	Thr	Pro	Tyr	Tyr	Asn	Arg	Pro	Ser	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Gln	His	Phe	
		105				110						115					
	aaa	gcc	atc	gct	gag	cat	act	gac	ctg	ccg	caa	att	ctg	tat	aat	gtg	676
30	Lys	Ala	Ile	Ala	Glu	His	Thr	Asp	Leu	Pro	Gln	Ile	Leu	Tyr	Asn	Val	
		120				125					130				135		
	ccg	tcc	cgt	act	ggc	tgc	gat	ctg	ctc	ccg	gaa	acg	gtg	ggc	cgt	ctg	724
	Pro	Ser	Arg	Thr	Gly	Cys	Asp	Leu	Leu	Pro	Glu	Thr	Val	Gly	Arg	Leu	
				140					145				150				
35	gcg	aaa	gta	aaa	aat	att	atc	gga	atc	aaa	gag	gca	aca	ggg	aac	tta	772
	Ala	Lys	Val	Lys	Asn	Ile	Ile	Gly	Ile	Lys	Glu	Ala	Thr	Gly	Asn	Leu	
			155					160					165				
40	acg	cgt	gta	aac	cag	atc	aaa	gag	ctg	gtt	tca	gat	gat	ttt	gtt	ctg	820
	Thr	Arg	Val	Asn	Gln	Ile	Lys	Glu	Leu	Val	Ser	Asp	Asp	Phe	Val	Leu	
			170					175					180				
	ctg	agc	ggc	gat	gat	gcg	agc	gcg	ctg	gac	ttc	atg	caa	ttg	ggc	ggt	868
45	Leu	Ser	Gly	Asp	Asp	Ala	Ser	Ala	Leu	Asp	Phe	Met	Gln	Leu	Gly	Gly	
		185				190					195						
	cat	ggg	gtt	att	tcc	gtt	acg	act	aac	gtc	gca	gcg	cgt	gat	atg	gcc	916

50

His Gly Val Ile Ser Val Thr Thr Asn Val Ala Ala Arg Asp Met Ala
 200 205 210 215
 cag atg tgc aaa ctg gca gca gaa gaa cat ttt gcc gag gca cgc gtt 964
 5 Gln Met Cys Lys Leu Ala Ala Glu Glu His Phe Ala Glu Ala Arg Val
 220 225 230
 att aat cag cgt ctg atg cca tta cac aac aaa cta ttt gtc gaa ccc 1012
 Ile Asn Gln Arg Leu Met Pro Leu His Asn Lys Leu Phe Val Glu Pro
 10 235 240 245
 aat cca atc ccg gtg aaa tgg gca tgt aag gaa ctg ggt ctt gtg gcg 1060
 Asn Pro Ile Pro Val Lys Trp Ala Cys Lys Glu Leu Gly Leu Val Ala
 250 255 260
 15 acc gat acg ctg cgc ctg cca atg aca cca atc acc gac agt ggt cgt 1108
 Thr Asp Thr Leu Arg Leu Pro Met Thr Pro Ile Thr Asp Ser Gly Arg
 265 270 275
 gag acg gtc aga gcg gcg ctt aag cat gcc ggt ttg ctg taaagtttag 1157
 Glu Thr Val Arg Ala Ala Leu Lys His Ala Gly Leu Leu
 20 280 285 290
 ggagatttga tggcttactc tgttcaaaag tcgcgcctgg 1197

<210> 2

25 <211> 292

<212> Белок

<213> Escherichia coli

30 <400> 2

Met Phe Thr Gly Ser Ile Val Ala Ile Val Thr Pro Met Asp Glu Lys
 1 5 10 15
 Gly Asn Val Cys Arg Ala Ser Leu Lys Lys Leu Ile Asp Tyr His Val
 35 20 25 30
 Ala Ser Gly Thr Ser Ala Ile Val Ser Val Gly Thr Thr Gly Glu Ser
 35 40 45
 Ala Thr Leu Asn His Asp Glu His Ala Asp Val Val Met Met Thr Leu
 40 50 55 60
 Asp Leu Ala Asp Gly Arg Ile Pro Val Ile Ala Gly Thr Gly Ala Asn
 65 70 75 80
 Ala Thr Ala Glu Ala Ile Ser Leu Thr Gln Arg Phe Asn Asp Ser Gly
 45 85 90 95
 Ile Val Gly Cys Leu Thr Val Thr Pro Tyr Tyr Asn Arg Pro Ser Gln

50

	100	105	110
	Glu Gly Leu Tyr Gln His Phe Lys Ala Ile Ala Glu His Thr Asp Leu		
	115	120	125
5	Pro Gln Ile Leu Tyr Asn Val Pro Ser Arg Thr Gly Cys Asp Leu Leu		
	130	135	140
	Pro Glu Thr Val Gly Arg Leu Ala Lys Val Lys Asn Ile Ile Gly Ile		
	145	150	155
10	Lys Glu Ala Thr Gly Asn Leu Thr Arg Val Asn Gln Ile Lys Glu Leu		
	165	170	175
	Val Ser Asp Asp Phe Val Leu Leu Ser Gly Asp Asp Ala Ser Ala Leu		
	180	185	190
15	Asp Phe Met Gln Leu Gly Gly His Gly Val Ile Ser Val Thr Thr Asn		
	195	200	205
	Val Ala Ala Arg Asp Met Ala Gln Met Cys Lys Leu Ala Ala Glu Glu		
	210	215	220
20	His Phe Ala Glu Ala Arg Val Ile Asn Gln Arg Leu Met Pro Leu His		
	225	230	235
	Asn Lys Leu Phe Val Glu Pro Asn Pro Ile Pro Val Lys Trp Ala Cys		
	245	250	255
25	Lys Glu Leu Gly Leu Val Ala Thr Asp Thr Leu Arg Leu Pro Met Thr		
	260	265	270
	Pro Ile Thr Asp Ser Gly Arg Glu Thr Val Arg Ala Ala Leu Lys His		
	275	280	285
30	Ala Gly Leu Leu		
	290		

<210> 3

35 <211> 2147

<212> ДНК

<213> Escherichia coli

40 <220>

<221> Кодирующая последовательность

<222> (584)..(1930)

45 <400> 3

tcgaagtgtt tctgtagtgc ctgccaggca gcggtctgcg ttggattgat gtttttcatt 60
agcaatactc ttctgatttt gagaattgtg actttggaag attgtagcgc cagtcacaga 120

50

aaaatgtgat ggTTTTtagtg cGtttagcgt aatgTtgagt gTaaaccett agcgcagtga 180
 agcatttatt agctgaacta ctgaccgcca ggagTggatg aaaaatccgc atgaccccat 240
 cgttgacaac cgccccgctc accctttatt tataaatgta ctacctgcgc tagcgcaggc 300
 5 cagaagaggc gcgttgccca agtaacggTg ttggaggagc cagtctctgtg ataacacctg 360
 agggggTgca tcgccgaggt gattgaacgg ctggccacgt tcatcatcgg ctaagggggc 420
 tgaatccctt gggTtgTcac cagaagcgtt cgcagtcggg cgtttcgcaa gtggTggagc 480
 acttctgggt gaaaatagta gcgaagtatc gctctgcgcc caccctctt cgcctcttcc 540
 10 cttgtgccaa ggctgaaaat ggatccctg acacgaggta gtt atg tct gaa att 595
 Met Ser Glu Ile
 1
 gtt gtc tcc aaa ttt ggc ggt acc agc gta gct gat ttt gac gcc atg 643
 Val Val Ser Lys Phe Gly Gly Thr Ser Val Ala Asp Phe Asp Ala Met
 15 5 10 15 20
 aac cgc agc gct gat att gtg ctt tct gat gcc aac gtg cgt tta gtt 691
 Asn Arg Ser Ala Asp Ile Val Leu Ser Asp Ala Asn Val Arg Leu Val
 25 30 35
 20 gtc ctc tcg gct tct gct ggt atc act aat ctg ctg gtc gct tta gct 739
 Val Leu Ser Ala Ser Ala Gly Ile Thr Asn Leu Leu Val Ala Leu Ala
 40 45 50
 gaa gga ctg gaa cct ggc gag cga ttc gaa aaa ctc gac gct atc cgc 787
 25 Glu Gly Leu Glu Pro Gly Glu Arg Phe Glu Lys Leu Asp Ala Ile Arg
 55 60 65
 aac atc cag ttt gcc att ctg gaa cgt ctg cgt tac ccg aac gtt atc 835
 Asn Ile Gln Phe Ala Ile Leu Glu Arg Leu Arg Tyr Pro Asn Val Ile
 70 75 80
 30 cgt gaa gag att gaa cgt ctg ctg gag aac att act gtt ctg gca gaa 883
 Arg Glu Glu Ile Glu Arg Leu Leu Glu Asn Ile Thr Val Leu Ala Glu
 85 90 95 100
 gcg gcg gcg ctg gca acg tct ccg gcg ctg aca gat gag ctg gtc agc 931
 35 Ala Ala Ala Leu Ala Thr Ser Pro Ala Leu Thr Asp Glu Leu Val Ser
 105 110 115
 cac ggc gag ctg atg tcg acc ctg ctg ttt gtt gag atc ctg cgc gaa 979
 His Gly Glu Leu Met Ser Thr Leu Leu Phe Val Glu Ile Leu Arg Glu
 40 120 125 130
 cgc gat gtt cag gca cag tgg ttt gat gta cgt aaa gtg atg cgt acc 1027
 Arg Asp Val Gln Ala Gln Trp Phe Asp Val Arg Lys Val Met Arg Thr
 135 140 145
 45 aac gac cga ttt ggt cgt gca gag cca gat ata gcc gcg ctg gcg gaa 1075

50

Asn Asp Arg Phe Gly Arg Ala Glu Pro Asp Ile Ala Ala Leu Ala Glu
 150 155 160
 ctg gcc gcg ctg cag ctg ctc cca cgt ctc aat gaa ggc tta gtg atc 1123
 5 Leu Ala Ala Leu Gln Leu Leu Pro Arg Leu Asn Glu Gly Leu Val Ile
 165 170 175 180
 acc cag gga ttt atc ggt agc gaa aat aaa ggt cgt aca acg acg ctt 1171
 Thr Gln Gly Phe Ile Gly Ser Glu Asn Lys Gly Arg Thr Thr Thr Leu
 185 190 195
 10 ggc cgt gga ggc agc gat tat acg gca gcc ttg ctg gcg gag gct tta 1219
 Gly Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Thr Ala Ala Leu Leu Ala Glu Ala Leu
 200 205 210
 cac gca tct cgt gtt gat atc tgg acc gac gtc ccg ggc atc tac acc 1267
 15 His Ala Ser Arg Val Asp Ile Trp Thr Asp Val Pro Gly Ile Tyr Thr
 215 220 225
 acc gat cca cgc gta gtt tcc gca gca aaa cgc att gat gaa atc gcg 1315
 Thr Asp Pro Arg Val Val Ser Ala Ala Lys Arg Ile Asp Glu Ile Ala
 20 230 235 240
 ttt gcc gaa gcg gca gag atg gca act ttt ggt gca aaa gta ctg cat 1363
 Phe Ala Glu Ala Ala Glu Met Ala Thr Phe Gly Ala Lys Val Leu His
 245 250 255 260
 25 ccg gca acg ttg cta ccc gca gta cgc agc gat atc ccg gtc ttt gtc 1411
 Pro Ala Thr Leu Leu Pro Ala Val Arg Ser Asp Ile Pro Val Phe Val
 265 270 275
 ggc tcc agc aaa gac cca cgc gca ggt ggt acg ctg gtg tgc aat aaa 1459
 30 Gly Ser Ser Lys Asp Pro Arg Ala Gly Gly Thr Leu Val Cys Asn Lys
 280 285 290
 act gaa aat ccg ccg ctg ttc cgc gct ctg gcg ctt cgt cgc aat cag 1507
 Thr Glu Asn Pro Pro Leu Phe Arg Ala Leu Ala Leu Arg Arg Asn Gln
 295 300 305
 35 act ctg ctc act ttg cac agc ctg aat atg ctg cat tct cgc ggt ttc 1555
 Thr Leu Leu Thr Leu His Ser Leu Asn Met Leu His Ser Arg Gly Phe
 310 315 320
 ctc gcg gaa gtt ttc ggc atc ctc gcg cgg cat aat att teg gta gac 1603
 40 Leu Ala Glu Val Phe Gly Ile Leu Ala Arg His Asn Ile Ser Val Asp
 325 330 335 340
 tta atc acc acg tca gaa gtg agc gtg gca tta acc ctt gat acc acc 1651
 45 Leu Ile Thr Thr Ser Glu Val Ser Val Ala Leu Thr Leu Asp Thr Thr
 345 350 355

50

ggt tca acc tcc act ggc gat acg ttg ctg acg caa tct ctg ctg atg 1699
 Gly Ser Thr Ser Thr Gly Asp Thr Leu Leu Thr Gln Ser Leu Leu Met
 360 365 370
 5 gag ott tcc gca ctg tgt cgg gtg gag gtg gaa gaa ggt ctg gcg ctg 1747
 Glu Leu Ser Ala Leu Cys Arg Val Glu Val Glu Glu Gly Leu Ala Leu
 375 380 385
 gtc gcg ttg att ggc aat gac ctg tca aaa gcc tgc ggc gtt ggc aaa 1795
 Val Ala Leu Ile Gly Asn Asp Leu Ser Lys Ala Cys Gly Val Gly Lys
 10 390 395 400
 gag gta ttc ggc gta ctg gaa ccg ttc aac att cgc atg att tgt tat 1843
 Glu Val Phe Gly Val Leu Glu Pro Phe Asn Ile Arg Met Ile Cys Tyr
 405 410 415 420
 15 ggc gca tcc agc cat aac ctg tgc ttc ctg gtg ccc ggc gaa gat gcc 1891
 Gly Ala Ser Ser His Asn Leu Cys Phe Leu Val Pro Gly Glu Asp Ala
 425 430 435
 gag cag gtg gtg caa aaa ctg cat agt aat ttg ttt gag taaatactgt 1940
 20 Glu Gln Val Val Gln Lys Leu His Ser Asn Leu Phe Glu
 440 445
 atggcctgga agctatatatt cgggccgtat tgattttctt gtcactatgc tcatcaataa 2000
 acgagcctgt actctgttaa ccagcgtctt tateggagaa taattgcctt taattttttt 2060
 25 atctgcatct ctaattaatt atcgaaagag ataaatagtt aagagaaggc aaaatgaata 2120
 ttatcagttc tgctcgcaaa ggaattc 2147

 <210> 4
 <211> 449
 30 <212> Белок
 <213> Escherichia coli

 <400> 4
 35 Met Ser Glu Ile Val Val Ser Lys Phe Gly Gly Thr Ser Val Ala Asp
 1 5 10 15
 Phe Asp Ala Met Asn Arg Ser Ala Asp Ile Val Leu Ser Asp Ala Asn
 20 25 30
 40 Val Arg Leu Val Val Leu Ser Ala Ser Ala Gly Ile Thr Asn Leu Leu
 35 40 45
 Val Ala Leu Ala Glu Gly Leu Glu Pro Gly Glu Arg Phe Glu Lys Leu
 50 55 60
 45 Asp Ala Ile Arg Asn Ile Gln Phe Ala Ile Leu Glu Arg Leu Arg Tyr

50

	65				70					75				80		
	Pro	Asn	Val	Ile	Arg	Glu	Glu	Ile	Glu	Arg	Leu	Leu	Glu	Asn	Ile	Thr
					85					90				95		
5	Val	Leu	Ala	Glu	Ala	Ala	Ala	Leu	Ala	Thr	Ser	Pro	Ala	Leu	Thr	Asp
				100					105					110		
	Glu	Leu	Val	Ser	His	Gly	Glu	Leu	Met	Ser	Thr	Leu	Leu	Phe	Val	Glu
				115					120					125		
10	Ile	Leu	Arg	Glu	Arg	Asp	Val	Gln	Ala	Gln	Trp	Phe	Asp	Val	Arg	Lys
				130					135					140		
	Val	Met	Arg	Thr	Asn	Asp	Arg	Phe	Gly	Arg	Ala	Glu	Pro	Asp	Ile	Ala
				145					150					155		160
15	Ala	Leu	Ala	Glu	Leu	Ala	Ala	Leu	Gln	Leu	Leu	Pro	Arg	Leu	Asn	Glu
					165					170					175	
	Gly	Leu	Val	Ile	Thr	Gln	Gly	Phe	Ile	Gly	Ser	Glu	Asn	Lys	Gly	Arg
				180					185					190		
20	Thr	Thr	Thr	Leu	Gly	Arg	Gly	Gly	Ser	Asp	Tyr	Thr	Ala	Ala	Leu	Leu
				195					200					205		
	Ala	Glu	Ala	Leu	His	Ala	Ser	Arg	Val	Asp	Ile	Trp	Thr	Asp	Val	Pro
				210					215					220		
25	Gly	Ile	Tyr	Thr	Thr	Asp	Pro	Arg	Val	Val	Ser	Ala	Ala	Lys	Arg	Ile
				225					230					235		240
	Asp	Glu	Ile	Ala	Phe	Ala	Glu	Ala	Ala	Glu	Met	Ala	Thr	Phe	Gly	Ala
					245					250					255	
30	Lys	Val	Leu	His	Pro	Ala	Thr	Leu	Leu	Pro	Ala	Val	Arg	Ser	Asp	Ile
				260						265					270	
	Pro	Val	Phe	Val	Gly	Ser	Ser	Lys	Asp	Pro	Arg	Ala	Gly	Gly	Thr	Leu
				275					280					285		
35	Val	Cys	Asn	Lys	Thr	Glu	Asn	Pro	Pro	Leu	Phe	Arg	Ala	Leu	Ala	Leu
				290						295				300		
	Arg	Arg	Asn	Gln	Thr	Leu	Leu	Thr	Leu	His	Ser	Leu	Asn	Met	Leu	His
				305						310				315		320
40	Ser	Arg	Gly	Phe	Leu	Ala	Glu	Val	Phe	Gly	Ile	Leu	Ala	Arg	His	Asn
					325					330					335	
	Ile	Ser	Val	Asp	Leu	Ile	Thr	Thr	Ser	Glu	Val	Ser	Val	Ala	Leu	Thr
				340						345				350		
45	Leu	Asp	Thr	Thr	Gly	Ser	Thr	Ser	Thr	Gly	Asp	Thr	Leu	Leu	Thr	Gln
				355						360				365		
	Ser	Leu	Leu	Met	Glu	Leu	Ser	Ala	Leu	Cys	Arg	Val	Glu	Val	Glu	Glu

50

370 375 380
 Gly Leu Ala Leu Val Ala Leu Ile Gly Asn Asp Leu Ser Lys Ala Cys
 385 390 395 400
 5 Gly Val Gly Lys Glu Val Phe Gly Val Leu Glu Pro Phe Asn Ile Arg
 405 410 415
 Met Ile Cys Tyr Gly Ala Ser Ser His Asn Leu Cys Phe Leu Val Pro
 420 425 430
 10 Gly Glu Asp Ala Glu Gln Val Val Gln Lys Leu His Ser Asn Leu Phe
 435 440 445
 Glu

15 <210> 5
 <211> 1981
 <212> ДНК
 20 <213> Methylophilus methylotrophus

<220>
 <221> Кодирующая последовательность
 25 <222> (510)..(1736)

<400> 5
 gtttaacgcg gccagtgaat ttgactcggg cccctgcctg gcaaaatcgc acaggtgatg 60
 30 gacaacgtga aatcgcttga aaaagaattg gcacgcctca agtccaagct ggctcctca 120
 caggggatg acctcgcgac gcaagcgag gacgtcaacg gcgccaagt actggcagcc 180
 acctcgacg gggcggatgc caatgccttg cgtgaaacca tggataagct caaagataaa 240
 ctcaaatctg cagtcattgt gctggcgagc gtggctgacg gtaaagtcag cctggctgcg 300
 35 ggtgtcacta ctgacttgac tggcaaggtc aaagcaggcg aagtttgtca atcatgtggc 360
 tggtcaggtc ggtggcaaag gtggtggtaa accggatatg gcgatggcag gtggtactga 420
 gcccgctaat ttgccgagg ctttgcaag tgtgaaggct tgggtagaaa caaaactaaa 480
 ttaatttaat tgattaacag agcgaaata atg gca tta atc gta caa aaa tat 533
 40 Met Ala Leu Ile Val Gln Lys Tyr
 1 5
 ggt ggt acc tcg gtg gct aat ccc gag cgt atc cgt aat gtg gcg cgt 581
 Gly Gly Thr Ser Val Ala Asn Pro Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Arg
 45 10 15 20
 cgc gtg gcg cgt tac aag gca ttg ggc cac cag gtg gtg gtt gtg gta 629
 Arg Val Ala Arg Tyr Lys Ala Leu Gly His Gln Val Val Val Val Val

50

	25		30		35		40	
	tcc gca atg tct ggt gaa acc aac cgg ttg atc tca ctg gcc aag gaa							677
	Ser Ala Met Ser Gly Glu Thr Asn Arg Leu Ile Ser Leu Ala Lys Glu							
5		45		50		55		
	atc atg caa gac cct gat cca cgt gag ctg gat gtg atg gta tca acc							725
	Ile Met Gln Asp Pro Asp Pro Arg Glu Leu Asp Val Met Val Ser Thr							
		60		65		70		
10	ggt gag cag gtc acc atc ggc atg acg gcc ctg gca ctg atg gag ctt							773
	Gly Glu Gln Val Thr Ile Gly Met Thr Ala Leu Ala Leu Met Glu Leu							
		75		80		85		
	ggc att aag gca aaa agc tat acc ggt acc cag gtt aag atc ttg act							821
15	Gly Ile Lys Ala Lys Ser Tyr Thr Gly Thr Gln Val Lys Ile Leu Thr							
		90		95		100		
	gac gat gct ttt acc aag gca cgt att ctg gat atc gac gaa cat aac							869
	Asp Asp Ala Phe Thr Lys Ala Arg Ile Leu Asp Ile Asp Glu His Asn							
	105		110		115		120	
20	ctg aaa aaa gac ctg gat gat ggc tat gtc tgc gtg gtg gct ggg ttc							917
	Leu Lys Lys Asp Leu Asp Asp Gly Tyr Val Cys Val Val Ala Gly Phe							
		125		130		135		
25	cag ggc gtg gat gcc aat ggc aat att acg acc ttg ggc cgt ggc ggc							965
	Gln Gly Val Asp Ala Asn Gly Asn Ile Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly							
		140		145		150		
	tca gat act act ggt gta gca ctg gct gcg gcg tta aag gcg gat gaa							1013
	Ser Asp Thr Thr Gly Val Ala Leu Ala Ala Ala Leu Lys Ala Asp Glu							
30		155		160		165		
	tgt cag att tat acc gat gtc gat ggc gtt tac acc acc gat ccg cgt							1061
	Cys Gln Ile Tyr Thr Asp Val Asp Gly Val Tyr Thr Thr Asp Pro Arg							
		170		175		180		
35	gtg gtg cct gag gca cgc cgc ttg gat aaa att acc ttt gaa gaa atg							1109
	Val Val Pro Glu Ala Arg Arg Leu Asp Lys Ile Thr Phe Glu Glu Met							
	185		190		195		200	
40	ttg gaa ctg gct tca cag ggc tcc aaa gta ttg caa att cgc tcg gtt							1157
	Leu Glu Leu Ala Ser Gln Gly Ser Lys Val Leu Gln Ile Arg Ser Val							
		205		210		215		
	gag ttt gcc ggt aaa tac aaa gtc aaa tta cgt gtg ctg tcc agc ttc							1205
	Glu Phe Ala Gly Lys Tyr Lys Val Lys Leu Arg Val Leu Ser Ser Phe							
45		220		225		230		
	gaa gag gag ggc gac ggt aca ctg atc aca ttc gaa gaa aat gag gaa							1253

50

Glu Glu Glu Gly Asp Gly Thr Leu Ile Thr Phe Glu Glu Asn Glu Glu
 235 240 245
 aac atg gaa gaa cca att atc tcc ggc atc gcc ttt aac cgc gat gag 1301
 5 Asn Met Glu Glu Pro Ile Ile Ser Gly Ile Ala Phe Asn Arg Asp Glu
 250 255 260
 gcg aaa att acc gtg acg ggc gtg ccc gac aaa cca gga att gcc tat 1349
 Ala Lys Ile Thr Val Thr Gly Val Pro Asp Lys Pro Gly Ile Ala Tyr
 10 265 270 275 280
 cag att ttg ggc ccg gtg gca gac gcc aat att gat gtg gat atg att 1397
 Gln Ile Leu Gly Pro Val Ala Asp Ala Asn Ile Asp Val Asp Met Ile
 285 290 295
 atc cag aac gtc ggt gcg gat ggt acg act gac ttc acc ttt acc gta 1445
 15 Ile Gln Asn Val Gly Ala Asp Gly Thr Thr Asp Phe Thr Phe Thr Val
 300 305 310
 cat aaa aat gag atg aac aaa gcc ctg agc att ctt aga gat aaa gtg 1493
 His Lys Asn Glu Met Asn Lys Ala Leu Ser Ile Leu Arg Asp Lys Val
 20 315 320 325
 cag ggc cat atc cag gca cgt gaa atc agc ggc gac gac aag att gcc 1541
 Gln Gly His Ile Gln Ala Arg Glu Ile Ser Gly Asp Asp Lys Ile Ala
 330 335 340
 25 aaa gtc tct gtg gtt ggg gtg ggt atg cgc tca cat gta ggg atc gcc 1589
 Lys Val Ser Val Val Gly Val Gly Met Arg Ser His Val Gly Ile Ala
 345 350 355 360
 agc cag atg ttc cgt acg ctg gcc gaa gaa ggg atc aat att caa atg 1637
 30 Ser Gln Met Phe Arg Thr Leu Ala Glu Glu Gly Ile Asn Ile Gln Met
 365 370 375
 atc tca acc agc gaa att aaa att gca gtc gtg atc gaa gag aag tac 1685
 Ile Ser Thr Ser Glu Ile Lys Ile Ala Val Val Ile Glu Glu Lys Tyr
 35 380 385 390
 atg gaa ctg gct gta cgc gtg ttg cat aaa gca ttc ggc ctc gaa aac 1733
 Met Glu Leu Ala Val Arg Val Leu His Lys Ala Phe Gly Leu Glu Asn
 395 400 405
 40 gca taatcgccaa cggacgaata aagaaataaa acattcttct tttttgcgtt 1786
 Ala
 gatttttgaa gggttttcac gtagtatggc agcccttcga tgcagtagca atgctgcaaa 1846
 gagaacagca tgccgctgtg ttggtactat taaaacttca ttgttttaat aaggtagagg 1906
 ggatcctcta gagtcgacct gcaggcatgc aagcttggcc gtaatccatg gtcatagctg 1966
 45 tttcctggtg tgaaa 1981

50

<210> 6

<211> 409

<212> Белок

5 <213> *Methylophilus methylotrophus*

<400> 6

Met Ala Leu Ile Val Gln Lys Tyr Gly Gly Thr Ser Val Ala Asn Pro
 10 1 5 10 15
 Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Arg Arg Val Ala Arg Tyr Lys Ala Leu
 20 25 30
 Gly His Gln Val Val Val Val Val Ser Ala Met Ser Gly Glu Thr Asn
 15 35 40 45
 Arg Leu Ile Ser Leu Ala Lys Glu Ile Met Gln Asp Pro Asp Pro Arg
 50 55 60
 Glu Leu Asp Val Met Val Ser Thr Gly Glu Gln Val Thr Ile Gly Met
 20 65 70 75 80
 Thr Ala Leu Ala Leu Met Glu Leu Gly Ile Lys Ala Lys Ser Tyr Thr
 85 90 95
 Gly Thr Gln Val Lys Ile Leu Thr Asp Asp Ala Phe Thr Lys Ala Arg
 25 100 105 110
 Ile Leu Asp Ile Asp Glu His Asn Leu Lys Lys Asp Leu Asp Asp Gly
 115 120 125
 Tyr Val Cys Val Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asp Ala Asn Gly Asn
 30 130 135 140
 Ile Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Gly Val Ala Leu
 145 150 155 160
 Ala Ala Ala Leu Lys Ala Asp Glu Cys Gln Ile Tyr Thr Asp Val Asp
 35 165 170 175
 Gly Val Tyr Thr Thr Asp Pro Arg Val Val Pro Glu Ala Arg Arg Leu
 180 185 190
 Asp Lys Ile Thr Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ser Gln Gly Ser
 40 195 200 205
 Lys Val Leu Gln Ile Arg Ser Val Glu Phe Ala Gly Lys Tyr Lys Val
 210 215 220
 Lys Leu Arg Val Leu Ser Ser Phe Glu Glu Glu Gly Asp Gly Thr Leu
 45 225 230 235 240
 Ile Thr Phe Glu Glu Asn Glu Glu Asn Met Glu Glu Pro Ile Ile Ser

50

245 250 255
 Gly Ile Ala Phe Asn Arg Asp Glu Ala Lys Ile Thr Val Thr Gly Val
 260 265 270
 5 Pro Asp Lys Pro Gly Ile Ala Tyr Gln Ile Leu Gly Pro Val Ala Asp
 275 280 285
 Ala Asn Ile Asp Val Asp Met Ile Ile Gln Asn Val Gly Ala Asp Gly
 290 295 300
 10 Thr Thr Asp Phe Thr Phe Thr Val His Lys Asn Glu Met Asn Lys Ala
 305 310 315 320
 Leu Ser Ile Leu Arg Asp Lys Val Gln Gly His Ile Gln Ala Arg Glu
 325 330 335
 15 Ile Ser Gly Asp Asp Lys Ile Ala Lys Val Ser Val Val Gly Val Gly
 340 345 350
 Met Arg Ser His Val Gly Ile Ala Ser Gln Met Phe Arg Thr Leu Ala
 355 360 365
 20 Glu Glu Gly Ile Asn Ile Gln Met Ile Ser Thr Ser Glu Ile Lys Ile
 370 375 380
 Ala Val Val Ile Glu Glu Lys Tyr Met Glu Leu Ala Val Arg Val Leu
 385 390 395 400
 25 His Lys Ala Phe Gly Leu Glu Asn Ala
 405

<210> 7

<211> 1452

30 <212> ДНК

<213> Methylophilus methylotrophus

<220>

35 <221> Кодирующая последовательность

<222> (98)..(1207)

<400> 7

40 gcatgccgc aggtcgactc tagaggatcc cctgttcaa aaatcttcca aataatcact 60
 gtaatgccgg gttgtccggc tgaatatcg agtcact atg tta aaa gta ggg ttt 115
 Met Leu Lys Val Gly Phe
 1 5
 45 gta ggc tgg cgt ggc atg gtt gga tcc gtg cta atg cag cgc atg atg 163
 Val Gly Trp Arg Gly Met Val Gly Ser Val Leu Met Gln Arg Met Met

50

	10	15	20	
	cag gaa aac gat ttt gcg gat att gaa ccg caa ttc ttt acg acc tca			211
	Gln Glu Asn Asp Phe Ala Asp Ile Glu Pro Gln Phe Phe Thr Thr Ser			
5	25	30	35	
	caa acg gga ggg gct gcg cct aaa gtt gga aaa gat act cct gcg ctg			259
	Gln Thr Gly Gly Ala Ala Pro Lys Val Gly Lys Asp Thr Pro Ala Leu			
	40	45	50	
10	aaa gat gcc aag gat att gat gct ttg cgc cag atg gat gtg att gtg			307
	Lys Asp Ala Lys Asp Ile Asp Ala Leu Arg Gln Met Asp Val Ile Val			
	55	60	65	70
	acc tgc cag ggt ggc gat tac acg agt gac gtc ttc cca caa ttg cgc			355
	Thr Cys Gln Gly Gly Asp Tyr Thr Ser Asp Val Phe Pro Gln Leu Arg			
15	75	80	85	
	gca acc ggc tgg agc ggc cac tgg att gac gcg gcc tct acc tta cgc			403
	Ala Thr Gly Trp Ser Gly His Trp Ile Asp Ala Ala Ser Thr Leu Arg			
	90	95	100	
20	atg gaa aaa gac tcc gtg atc att tta gac ccg gtg aac atg cat gtg			451
	Met Glu Lys Asp Ser Val Ile Ile Leu Asp Pro Val Asn Met His Val			
	105	110	115	
	att aaa gat gca ttg tcc aat ggc ggc aaa aac tgg atc ggc ggc aac			499
25	Ile Lys Asp Ala Leu Ser Asn Gly Gly Lys Asn Trp Ile Gly Gly Asn			
	120	125	130	
	tgt acc gtc tca ctt atg ttg atg gcg ctg aat ggc ctg ttt aag gct			547
	Cys Thr Val Ser Leu Met Leu Met Ala Leu Asn Gly Leu Phe Lys Ala			
	135	140	145	150
30	gac ctg gtc gag tgg gcc act tcc atg acc tac cag gcg gct tca ggc			595
	Asp Leu Val Glu Trp Ala Thr Ser Met Thr Tyr Gln Ala Ala Ser Gly			
	155	160	165	
35	gca ggc gcg cag aat atg cgt gaa ctg att agc cag atg ggc gta gtg			643
	Ala Gly Ala Gln Asn Met Arg Glu Leu Ile Ser Gln Met Gly Val Val			
	170	175	180	
	aat gcc tcc gtg gct gat ttg ctg gcg gat cca gct tct gcc att ttg			691
	Asn Ala Ser Val Ala Asp Leu Leu Ala Asp Pro Ala Ser Ala Ile Leu			
40	185	190	195	
	cag atc gat aaa aca gtg gcg gat acc atc cgt agc gaa gag ttg cct			739
	Gln Ile Asp Lys Thr Val Ala Asp Thr Ile Arg Ser Glu Glu Leu Pro			
	200	205	210	
45	aaa tct aac ttt ggt gtg cca ttg gcg ggc agt ctg atc cca tgg atc			787

50

Lys Ser Asn Phe Gly Val Pro Leu Ala Gly Ser Leu Ile Pro Trp Ile
 215 220 225 230
 gac aag gac tta ggg aat ggt caa agt aaa gaa gaa tgg aag ggc ggc 835
 5 Asp Lys Asp Leu Gly Asn Gly Gln Ser Lys Glu Glu Trp Lys Gly Gly
 235 240 245
 gta nag acc aat aag att tta ggt cgt gaa gcg aac ccg att gtg att 883
 Val Xaa Thr Asn Lys Ile Leu Gly Arg Glu Ala Asn Pro Ile Val Ile
 250 255 260
 10 gac ggt ttg tgt gta cgt atc ggc gcc atg cgt tgc cat tca caa gcg 931
 Asp Gly Leu Cys Val Arg Ile Gly Ala Met Arg Cys His Ser Gln Ala
 265 270 275
 15 ttg act atc aag ctg cgc aag gat gtg ccg ctg gat gaa atc aat cag 979
 Leu Thr Ile Lys Leu Arg Lys Asp Val Pro Leu Asp Glu Ile Asn Gln
 280 285 290
 atg ctg gct gaa gcg aac gac tgg gct aaa gtc att ccc aat gag cgt 1027
 Met Leu Ala Glu Ala Asn Asp Trp Ala Lys Val Ile Pro Asn Glu Arg
 20 295 300 305 310
 gag gtc agt atg cgg gaa ctc acc ccg gca gcg att acc ggc agt ctg 1075
 Glu Val Ser Met Arg Glu Leu Thr Pro Ala Ala Ile Thr Gly Ser Leu
 315 320 325
 25 gcg acg cca gta ggg cgt ttg cgc aaa ctg gcg atg ggt ggt gaa tac 1123
 Ala Thr Pro Val Gly Arg Leu Arg Lys Leu Ala Met Gly Gly Glu Tyr
 330 335 340
 ttg tcg gca ttt acc gta ggt gac cag ttg tta tgg ggc gct gcc gaa 1171
 30 Leu Ser Ala Phe Thr Val Gly Asp Gln Leu Leu Trp Gly Ala Ala Glu
 345 350 355
 cct ttg cgc aga atg ttg agg att ctg gtc gaa tct taagtaattg 1217
 Pro Leu Arg Arg Met Leu Arg Ile Leu Val Glu Ser
 35 360 365 370
 ttaagtagc agcccgtaaa gctatgattt atcaataaaa tcatggcttt ttcggtttt 1277
 tgcttttggg gcaatcctgt ttaatggta ttgtagcctc aaatcctgta tttattgctc 1337
 tcaagccgcc tgggtgcgct tgcgtggctg ggtgaatgat gctattttga caaacgccat 1397
 40 gaattactaa gggttaatcg gtgagtaaat ttcaattaa aaaaatagcc tttgc 1452

 <210> 8
 <211> 370
 <212> Белок
 45 <213> Methylophilus methylotrophus

50

<400> 8

Met Leu Lys Val Gly Phe Val Gly Trp Arg Gly Met Val Gly Ser Val
 1 5 10 15
 5 Leu Met Gln Arg Met Met Gln Glu Asn Asp Phe Ala Asp Ile Glu Pro
 20 25 30
 Gln Phe Phe Thr Thr Ser Gln Thr Gly Gly Ala Ala Pro Lys Val Gly
 35 40 45
 10 Lys Asp Thr Pro Ala Leu Lys Asp Ala Lys Asp Ile Asp Ala Leu Arg
 50 55 60
 Gln Met Asp Val Ile Val Thr Cys Gln Gly Gly Asp Tyr Thr Ser Asp
 65 70 75 80
 15 Val Phe Pro Gln Leu Arg Ala Thr Gly Trp Ser Gly His Trp Ile Asp
 85 90 95
 Ala Ala Ser Thr Leu Arg Met Glu Lys Asp Ser Val Ile Ile Leu Asp
 100 105 110
 20 Pro Val Asn Met His Val Ile Lys Asp Ala Leu Ser Asn Gly Gly Lys
 115 120 125
 Asn Trp Ile Gly Gly Asn Cys Thr Val Ser Leu Met Leu Met Ala Leu
 130 135 140
 25 Asn Gly Leu Phe Lys Ala Asp Leu Val Glu Trp Ala Thr Ser Met Thr
 145 150 155 160
 Tyr Gln Ala Ala Ser Gly Ala Gly Ala Gln Asn Met Arg Glu Leu Ile
 165 170 175
 30 Ser Gln Met Gly Val Val Asn Ala Ser Val Ala Asp Leu Leu Ala Asp
 180 185 190
 Pro Ala Ser Ala Ile Leu Gln Ile Asp Lys Thr Val Ala Asp Thr Ile
 195 200 205
 35 Arg Ser Glu Glu Leu Pro Lys Ser Asn Phe Gly Val Pro Leu Ala Gly
 210 215 220
 Ser Leu Ile Pro Trp Ile Asp Lys Asp Leu Gly Asn Gly Gln Ser Lys
 225 230 235 240
 40 Glu Glu Trp Lys Gly Gly Val Xaa Thr Asn Lys Ile Leu Gly Arg Glu
 245 250 255
 Ala Asn Pro Ile Val Ile Asp Gly Leu Cys Val Arg Ile Gly Ala Met
 260 265 270
 45 Arg Cys His Ser Gln Ala Leu Thr Ile Lys Leu Arg Lys Asp Val Pro
 275 280 285

50

Leu Asp Glu Ile Asn Gln Met Leu Ala Glu Ala Asn Asp Trp Ala Lys
 290 295 300
 Val Ile Pro Asn Glu Arg Glu Val Ser Met Arg Glu Leu Thr Pro Ala
 5 305 310 315 320
 Ala Ile Thr Gly Ser Leu Ala Thr Pro Val Gly Arg Leu Arg Lys Leu
 325 330 335
 Ala Met Gly Gly Glu Tyr Leu Ser Ala Phe Thr Val Gly Asp Gln Leu
 10 340 345 350
 Leu Trp Gly Ala Ala Glu Pro Leu Arg Arg Met Leu Arg Ile Leu Val
 355 360 365
 Glu Ser
 15 370

<210> 9
 <211> 3098
 <212> ДНК
 20 <213> Methylophilus methylotrophus

 <220>
 <221> Кодирующая последовательность
 25 <222> (1268)..(2155)

<400> 9
 30 cgtgccaaact tgcattgctg ccggtcgtc tagaggatca attgctggca acatttgagt 60
 acattattcg cctttgcatg gtaaaggcct atggctctga tgtaacttc aagacctgcc 120
 agcccaaat ccaggatagc ctgcggtgtg ttggccacct tgaacaattt gcggttgcca 180
 atattgacac ctttgtctgt cgctgtgca gacaagatga cggcaatcag taattgcaac 240
 gtggagctat gctccagctc agtggttga ttggggatgg cttgggccag ccgctcaaat 300
 35 atcgccagtc tttttgtgc attcataaaa cggtttcaat cataggtcac agggctcaacc 360
 tgtcttttgc gctttgacgc gcgccatggc tgcggcaatg gcatttttct tgagcacctc 420
 agttgagggt gtctcggtcg tagcaagcgt ctggttgcgt ttgctgtagg tttgggcggt 480
 ctccgtttt tcaagggcga ggcgagaaag gcgttgcctg tggegttgc tcgctaccgc 540
 40 ggcttcagct tcattcatgg cggtagcccg accgggaatc gtttgcattc gtatgcagtc 600
 caccgggcag ggcggtaaac atagctcaca gccagtgcatt tectgggaaa tcaccgtatg 660
 catcagtttg gatgcgcccc aatggcatc aacgggacag gcctgtatac acagggtgca 720
 gccgatgcatt gtttctcat caatcaagge caccgctttg ggtttggtga tgccgtgggc 780
 45 cggatttaat gcctggaaag gacgttgcag taatttgcca agcgcattgaa tgcccgcttc 840
 tectccagge ggacattggt tgatattggc ctctccgagg gcgatcgctt cagcataagg 900

50

tttgcatccc tcgtaaccgc attggcggca ttgagtttgc ggtaataccg cgtcgatctt 960
 tgcaatgagg tcgacaaagc gttctggcag ctcaggcgca gtcccttoga cttcaatcat 1020
 gtgatggcag gtgagtctgc attcggctct ggctaaatag ccgtttaaga tgggttgcta 1080
 5 agagttttat tataaccgaa accttgcttt tcctttggcc gggagctagg cggaaaaage 1140
 ttgccgcagt tgggtgccag tgattttgcc gccgtcttgc gcttgtatcc gtccagatac 1200
 agcaagtagg cgcgctcttt ggcgtttagac cggataatca gttaaaatat tcgctttatt 1260
 cttaaag atg gcg cta ggt atg tta acg ggc agt ttg gtc gca atc gtg 1309
 Met Ala Leu Gly Met Leu Thr Gly Ser Leu Val Ala Ile Val
 10 1 5 10
 acc ccc atg ttt gaa gat gga cgt ttg gat ctg gac gcc ctc aaa aag 1357
 Thr Pro Met Phe Glu Asp Gly Arg Leu Asp Leu Asp Ala Leu Lys Lys
 15 15 20 25 30
 15 ctg gtc gac ttt cat gta gag gca ggg aca gat ggt att gtc atc gtt 1405
 Leu Val Asp Phe His Val Glu Ala Gly Thr Asp Gly Ile Val Ile Val
 35 40 45
 20 ggc acg act ggc gag tcg ccc acg gtg gat gta gat gag cat tgt ctg 1453
 Gly Thr Thr Gly Glu Ser Pro Thr Val Asp Val Asp Glu His Cys Leu
 50 55 60
 ctg atc aaa acc acg atc gag cat gtc gcc aag cgc gtg cca gtc att 1501
 Leu Ile Lys Thr Thr Ile Glu His Val Ala Lys Arg Val Pro Val Ile
 25 65 70 75
 gcc ggt act ggc gca aat tcc act gct gaa gcc att gaa ctg act gcc 1549
 Ala Gly Thr Gly Ala Asn Ser Thr Ala Glu Ala Ile Glu Leu Thr Ala
 80 85 90
 30 aag gcc aag gcg ctt ggc gca gac gcc tgc ctg ctg gtg gca ccg tat 1597
 Lys Ala Lys Ala Leu Gly Ala Asp Ala Cys Leu Leu Val Ala Pro Tyr
 95 100 105 110
 tac aac aag ccc tcg caa gag ggt ttg tac cag cac ttt aaa gcc gtg 1645
 35 Tyr Asn Lys Pro Ser Gln Glu Gly Leu Tyr Gln His Phe Lys Ala Val
 115 120 125
 gct gag gcg gtc gat att ccg caa att ctc tat aat gtg cca ggc cgc 1693
 Ala Glu Ala Val Asp Ile Pro Gln Ile Leu Tyr Asn Val Pro Gly Arg
 40 130 135 140
 acc ggt tgc gac ttg tct aac gac acc gta ttg cgc ctg gcg cag att 1741
 Thr Gly Cys Asp Leu Ser Asn Asp Thr Val Leu Arg Leu Ala Gln Ile
 145 150 155
 45 cgc aac att gtc ggg att aag gat gcg act gga ggg att gag cgc ggt 1789
 Arg Asn Ile Val Gly Ile Lys Asp Ala Thr Gly Gly Ile Glu Arg Gly

50

	160	165	170	
	acc gat ttg ttg ttg cgt gca cca gct gat ttc gcc att tac agc ggg			1837
	Thr Asp Leu Leu Leu Arg Ala Pro Ala Asp Phe Ala Ile Tyr Ser Gly			
5	175	180	185	190
	gat gat gcc act gcg ctg gcc ctg atg tta tta ggg ggg aaa ggc gtg			1885
	Asp Asp Ala Thr Ala Leu Ala Leu Met Leu Leu Gly Gly Lys Gly Val			
		195	200	205
10	att tcg gtc acg gcc aat gtc gcg ccc aaa tta atg cat gaa atg tgc			1933
	Ile Ser Val Thr Ala Asn Val Ala Pro Lys Leu Met His Glu Met Cys			
		210	215	220
	gag cat gct ttg aat ggc aac ctg gcc gca gcc aaa gcg gcc aat gcc			1981
	Glu His Ala Leu Asn Gly Asn Leu Ala Ala Ala Lys Ala Ala Asn Ala			
15	225	230	235	
	aaa ctg ttt gca ttg cac cag aag ttg ttt gta gaa gcg aac ccg att			2029
	Lys Leu Phe Ala Leu His Gln Lys Leu Phe Val Glu Ala Asn Pro Ile			
	240	245	250	
20	cca gtg aaa tgg gta tta caa caa atg gga atg att gcc act ggc atc			2077
	Pro Val Lys Trp Val Leu Gln Gln Met Gly Met Ile Ala Thr Gly Ile			
	255	260	265	270
	cgt ttg ccg ctg gtc aat tta tcc agc caa tat cat gaa gta ttg cgc			2125
	Arg Leu Pro Leu Val Asn Leu Ser Ser Gln Tyr His Glu Val Leu Arg			
25		275	280	285
	aac gcc atg aag cag gca gaa att gcc gct tgatcggcta aaactaattt			2175
	Asn Ala Met Lys Gln Ala Glu Ile Ala Ala			
	290	295		
30	agggtgaaac aagtgaata catgagtcac gtttggttac aacgtttggt gctggccagt			2235
	ctggteacag cgttttcagc gtgcgattcc atcccgttta ttgataatag ttctgactac			2295
	aagggcgcag gtcgctccag gccacttgaa gtgcgcgcag acctgaccgc ggtgcgtacc			2355
	agcagtactt acaatgtgcc tggtagcacc agttactctg cctatagcca gaaccaggaa			2415
35	gtgcaagagc agaatggtcc acagcctgtg ctgcgagata tgaaaaacgt gcgcatggtg			2475
	aaagcaggcc agcagcgttg gctggtggtc aatgcgcctc cggaaaaaat ctggccgatt			2535
	gtgcgtgatt tctggctgga tcaaggcttt gctgtcaggg tagagaatcc tgagcttggc			2595
	gtgattgaaa ccgagtggtt gcaatctgat gccatcaagc ctaaggaaga taaccgtggc			2655
40	tatggtgaaa agtttgatgc ctggctggat aaactttctg gttttgccga caggcgtaaa			2715
	ttccgtacgc gtctggaacg tggggagaaa gacggcacca ccgaaatcta tatgacgcac			2775
	cgtactgtcg ccggtgcacc ggatgatggc aaaaattatg tgcagaccca attgggtgtc			2835
	attgataccg gttatcgccc caacgcggct gaaaacaaga acaatgccgg taaagagttt			2895
45	gatgctgact tggatgcaga attactccgt cgaatgatgg tgaaattagg tctggatgag			2955

50

cagaaagcag accaggtgat ggcacaatct gcttcagaca agcgtgcaga tgtggtcaag 3015
 gagtctgacc agagcgtcac cttgaagttg aatgagccgt ttgaccgtgc ctggcgccgt 3075
 gtggcctggc ctggatcccc ggg 3098

5

<210> 10

<211> 296

<212> Белок

10

<213> Methylophilus methylotrophus

<400> 10

15

Met Ala Leu Gly Met Leu Thr Gly Ser Leu Val Ala Ile Val Thr Pro
 1 5 10 15

Met Phe Glu Asp Gly Arg Leu Asp Leu Asp Ala Leu Lys Lys Leu Val
 20 25 30

Asp Phe His Val Glu Ala Gly Thr Asp Gly Ile Val Ile Val Gly Thr
 35 40 45

20

Thr Gly Glu Ser Pro Thr Val Asp Val Asp Glu His Cys Leu Leu Ile
 50 55 60

Lys Thr Thr Ile Glu His Val Ala Lys Arg Val Pro Val Ile Ala Gly
 65 70 75 80

25

Thr Gly Ala Asn Ser Thr Ala Glu Ala Ile Glu Leu Thr Ala Lys Ala
 85 90 95

Lys Ala Leu Gly Ala Asp Ala Cys Leu Leu Val Ala Pro Tyr Tyr Asn
 100 105 110

30

Lys Pro Ser Gln Glu Gly Leu Tyr Gln His Phe Lys Ala Val Ala Glu
 115 120 125

Ala Val Asp Ile Pro Gln Ile Leu Tyr Asn Val Pro Gly Arg Thr Gly
 130 135 140

35

Cys Asp Leu Ser Asn Asp Thr Val Leu Arg Leu Ala Gln Ile Arg Asn
 145 150 155 160

Ile Val Gly Ile Lys Asp Ala Thr Gly Gly Ile Glu Arg Gly Thr Asp
 165 170 175

40

Leu Leu Leu Arg Ala Pro Ala Asp Phe Ala Ile Tyr Ser Gly Asp Asp
 180 185 190

Ala Thr Ala Leu Ala Leu Met Leu Leu Gly Gly Lys Gly Val Ile Ser
 195 200 205

45

Val Thr Ala Asn Val Ala Pro Lys Leu Met His Glu Met Cys Glu His
 210 215 220

50

Ala Leu Asn Gly Asn Leu Ala Ala Ala Lys Ala Ala Asn Ala Lys Leu
 225 230 235 240
 Phe Ala Leu His Gln Lys Leu Phe Val Glu Ala Asn Pro Ile Pro Val
 245 250 255
 5 Lys Trp Val Leu Gln Gln Met Gly Met Ile Ala Thr Gly Ile Arg Leu
 260 265 270
 Pro Leu Val Asn Leu Ser Ser Gln Tyr His Glu Val Leu Arg Asn Ala
 275 280 285
 10 Met Lys Gln Ala Glu Ile Ala Ala
 290 295

15 <210> 11
 <211> 3390
 <212> ДНК
 <213> *Methylophilus methylotrophus*

20 <220>
 <221> Кодирующая последовательность
 <222> (2080)..(2883)

25 <400> 11

ccgcaggtcg ctctagagga tcagagttgg acggacaagc tgaagttttg ggagtctgaa 60
 gaagctgcgg gcgaagtgat aaagcagctg aatcaactgt agccactgca agcgacgaat 120
 gaaagcaaag gcgctgcact cgctaaggat gaggcagccg aatctcagaa aaccacgtca 180
 30 gagcctgtca aggccgagca agaggtattg cctctggcca ctgcaacaaa taattcagct 240
 gctgcagcga cattggetga agaagaagtg gtccctaca ttcggaggg ggagtatcag 300
 gctgcaccca ctccagaaga gatggccaag ggtaatctgg atgtcagtga aaaccaggtt 360
 actgaggcta aggcacatcc agtgaatgaa aaggaaatgg ctgccccaat tgcagatacg 420
 35 gttgagccac caccgtttt tcagcaggaa ccgatggcag aacctattgt agcggctgaa 480
 cccgaaccgg tattgccacc gcccgtaaaa gccgaaccag ctgtgaagaa taccacagcg 540
 ccagttgttg ccgcagccac tgttgccagc gcggcaacca agactgctga atctgagtca 600
 gttaaateca aacctgttga tcctaagcct gtggaagcaa aaaccgctgt atcaaaaact 660
 40 gaagtacaaa caccgcggc acaggcaact gctgcggcag cggccgttga agatgacgag 720
 gtcattccat atattcccga aggtgaatat gtgctctctg tcattcctag tgaggccgaa 780
 atggttaaag gcaatatggc ggaggcaaat gcacctgcga ctgatgctca agcgcgccag 840
 gtaactgaaa aaggggtggc acccacatcg gatgcggcag cagagccatc accgacattt 900
 45 gtcgctgagc aattgccaga accagagcca gaacctgaat tgccaccgcc gcctccgcca 960
 tccgtcagca agcctgttgt gagagaggta gcgccagtgg ctgcgctggc agcagaagaa 1020

50

gagaaaccag tcgctgcgca gcctgagact gagcagccgg ctgccaaggt tgttgagcct 1080
 gcatecggtcg cctccccctgt ggcgacgcca gaagcgccag ctggtgatgc tgaatcaac 1140
 caggctgtgg cggcatgggc acaagcttgg cgcagcaagg acattaataaa ctacctcget 1200
 5 gcatatgccc ctgacttcat gccagaaggg ttgccttcca gaaaggcatg ggagtcgcaa 1260
 cgcaaacagc gtttatctgc aggccagggt gcgattacac tcgtactaaa taatgtgcag 1320
 attcagcgtg acggtaccac tgtcgccgtg cagtttgagc aaaaatatgc tgctaaagtt 1380
 tataaagatg aattggtcaa aacactggaa atgcgttaag agccaacgca gaaacgttgg 1440
 10 ttgatcacac gtgaacgtgt tgccecttta accggtttgc cagtagcgag tgtgccaacg 1500
 acccgtctgc cagcagtcgc tgcagcgtca tccaatacgg atgtggtcga gtcagctgtg 1560
 ccaccgacac aatcgacatc atctgcgect gtacggaag tgagtgttga atcagcgatt 1620
 gacgcctggg cacaggcttg gcgcagtaaa aacatcaatg cttactttgc ggcgtattct 1680
 ccagaatttg tgccggaggg attgccaaac agagggtgtct gggaagcgca acgtaaaaag 1740
 15 cgcttgctcc cacagcaggg caagatcagc ctggatgtca cgaatgtaag cgtgagccgc 1800
 gaaggagaaa cagccgtggc cacctttagg cagaaatatg cgtctaagc ctatcgtgat 1860
 gaagtagtga agcgtctaca gttaaaactg gatgctgcaa gcaatcgtg gctgattgtg 1920
 cgtgaaaagta ccggtagtga ggcagaagtg ccaatgggca agcagtcagt gagtgcgcca 1980
 20 gaagagagct cggaacatca ggatggtgct ctggagccga tcggatttta atggtctgct 2040
 gatgctgtgg ttaagtatt aaaaataatt gagtgagtt atg ttg aaa gta gtg 2094
 Met Leu Lys Val Val
 1 5
 25 att gct ggc gtg tct ggt cgt atg gga cat gcc tta ctg gat gga gtt 2142
 Ile Ala Gly Val Ser Gly Arg Met Gly His Ala Leu Leu Asp Gly Val
 10 15 20
 ttt tct gat aac ggc ttg cag ttg cac gcg gca ctc gat cgt gct gaa 2190
 30 Phe Ser Asp Asn Gly Leu Gln Leu His Ala Ala Leu Asp Arg Ala Glu
 25 30 35
 agc gcc atg ata ggg cgg gat gca ggc gag cag ttt ggc aag gtc agt 2238
 Ser Ala Met Ile Gly Arg Asp Ala Gly Glu Gln Phe Gly Lys Val Ser
 35 40 45 50
 ggc gtg aaa atc acg gct gac atc cat gcc gca ttg gtc ggt gcc gat 2286
 Gly Val Lys Ile Thr Ala Asp Ile His Ala Ala Leu Val Gly Ala Asp
 55 60 65
 40 gtg ctg gtg gat ttc acg cgg ccg gaa gcc agt atg caa tat tta caa 2334
 Val Leu Val Asp Phe Thr Arg Pro Glu Ala Ser Met Gln Tyr Leu Gln
 70 75 80 85
 gcc tgc cag caa gcc aac gtt aaa tta gtg att ggt act acc ggg ttt 2382
 45 Ala Cys Gln Gln Ala Asn Val Lys Leu Val Ile Gly Thr Thr Gly Phe
 90 95 100

50

agt gag gca gaa aag gcc agt att gag gct gcg tcc aaa aat atc ggt 2430
 Ser Glu Ala Glu Lys Ala Ser Ile Glu Ala Ala Ser Lys Asn Ile Gly
 105 110 115
 5 atc gta ttt gct cca aac atg agc gta ggg gtc acc ctc ttg att aac 2478
 Ile Val Phe Ala Pro Asn Met Ser Val Gly Val Thr Leu Leu Ile Asn
 120 125 130
 ctg gtt gag caa gcc gca cgg gtg ctc aat gaa ggc tat gat att gag 2526
 10 Leu Val Glu Gln Ala Ala Arg Val Leu Asn Glu Gly Tyr Asp Ile Glu
 135 140 145
 gtg gtt gaa atg cat cac cgc cat aag gtg gat gcg cct tca ggc acg 2574
 Val Val Glu Met His His Arg His Lys Val Asp Ala Pro Ser Gly Thr
 150 155 160 165
 15 gct tta cgg ttg ggt gag gct gcg gca aaa ggg att gat aaa gcg ctt 2622
 Ala Leu Arg Leu Gly Glu Ala Ala Ala Lys Gly Ile Asp Lys Ala Leu
 170 175 180
 aaa gat tgt gct gtg tat gcg cgc gaa ggc gtg act ggt gaa cgc gaa 2670
 20 Lys Asp Cys Ala Val Tyr Ala Arg Glu Gly Val Thr Gly Glu Arg Glu
 185 190 195
 gcg ggc acg att ggt ttt gca acc tta cgt ggt ggg gat gtg gtc ggt 2718
 Ala Gly Thr Ile Gly Phe Ala Thr Leu Arg Gly Gly Asp Val Val Gly
 25 200 205 210
 gac cat acg gtg gtt ctg gct ggt gtg ggt gag cga gta gag tta acg 2766
 Asp His Thr Val Val Leu Ala Gly Val Gly Glu Arg Val Glu Leu Thr
 215 220 225
 cat aaa gca tca agc cgt gcc aca ttt gca caa ggt gcg tta cgt gcg 2814
 30 His Lys Ala Ser Ser Arg Ala Thr Phe Ala Gln Gly Ala Leu Arg Ala
 230 235 240 245
 gct aaa ttt ctg gct gat aaa ccc aag gga ttg ttt gat atg cgt gat 2862
 Ala Lys Phe Leu Ala Asp Lys Pro Lys Gly Leu Phe Asp Met Arg Asp
 35 250 255 260
 gtg ttg gga ttt gaa aag aac tgatcttag taggcgatcc cgtctggcta 2913
 Val Leu Gly Phe Glu Lys Asn
 265
 40 aggtctggca ggaatcgtct gatgcttctg agttgccctt gagtgggctg tcaatgtacg 2973
 ctataatgct gtaattctga aacgggaaga gtcgaacaag cttttcccg tttgcacatc 3033
 tattcactgc agcttgaatt tcacttccag ccatggtgaa cctctaaaa gatgtgttcc 3093
 gtgtcaaact taaggagcta aagggtgtcaa aaacaattcc agcgattctc gtgttagcag 3153
 45 atggaactgt ttttaagggc attagcattg gcgcttccgg tcatacggtg ggtgaggtgg 3213

50

tgtttaatac ctccatcacc ggttatcagg agattcttac cgatccttcc tataccgaac 3273
 aaatcgtgac actgacctat ccgcacattg gtaactacgg gaccaatcgt gaagatggga 3333
 gtcaggtaaa gtctatgctg cgggtctgat ccccgggacc gagccgggtt cgtaaag 3390

5

<210> 12

<211> 268

<212> Белок

<213> Methylophilus methylotrophus

10

<400> 12

Met Leu Lys Val Val Ile Ala Gly Val Ser Gly Arg Met Gly His Ala
 1 5 10 15

15

Leu Leu Asp Gly Val Phe Ser Asp Asn Gly Leu Gln Leu His Ala Ala
 20 25 30

Leu Asp Arg Ala Glu Ser Ala Met Ile Gly Arg Asp Ala Gly Glu Gln
 35 40 45

20

Phe Gly Lys Val Ser Gly Val Lys Ile Thr Ala Asp Ile His Ala Ala
 50 55 60

Leu Val Gly Ala Asp Val Leu Val Asp Phe Thr Arg Pro Glu Ala Ser
 65 70 75 80

25

Met Gln Tyr Leu Gln Ala Cys Gln Gln Ala Asn Val Lys Leu Val Ile
 85 90 95

Gly Thr Thr Gly Phe Ser Glu Ala Glu Lys Ala Ser Ile Glu Ala Ala
 100 105 110

30

Ser Lys Asn Ile Gly Ile Val Phe Ala Pro Asn Met Ser Val Gly Val
 115 120 125

Thr Leu Leu Ile Asn Leu Val Glu Gln Ala Ala Arg Val Leu Asn Glu
 130 135 140

35

Gly Tyr Asp Ile Glu Val Val Glu Met His His Arg His Lys Val Asp
 145 150 155 160

Ala Pro Ser Gly Thr Ala Leu Arg Leu Gly Glu Ala Ala Ala Lys Gly
 165 170 175

40

Ile Asp Lys Ala Leu Lys Asp Cys Ala Val Tyr Ala Arg Glu Gly Val
 180 185 190

Thr Gly Glu Arg Glu Ala Gly Thr Ile Gly Phe Ala Thr Leu Arg Gly
 195 200 205

45

Gly Asp Val Val Gly Asp His Thr Val Val Leu Ala Gly Val Gly Glu
 210 215 220

50

Arg Val Glu Leu Thr His Lys Ala Ser Ser Arg Ala Thr Phe Ala Gln
 225 230 235 240
 Gly Ala Leu Arg Ala Ala Lys Phe Leu Ala Asp Lys Pro Lys Gly Leu
 245 250 255
 5 Phe Asp Met Arg Asp Val Leu Gly Phe Glu Lys Asn
 260 265

10 <210> 13
 <211> 2566
 <212> ДНК
 <213> Methylophilus methylotrophus

15 <220>
 <221> Кодирующая последовательность
 <222> (751)..(1995)

20 <400> 13

tgcttaggg ggaacctaga g gatccccct acccgaggaa gaagtgagcc aacatgtact 60
 tccagtcgta ccatcaaaag tagaagtttt cggcgttatc ctgattcaca gtaaaccgaaa 120
 aattgcccac attctgaccg gatttaccgg tggcttttaa ggtataagtg gtcgctgact 180
 25 ggtttcctaat gctgtaatca aaaaatttgg catcactggg gacacaggca aatcccacat 240
 atgtgaagtt gtctgataa aactgttcgg cctgcacacg gcaattggca agattggcag 300
 gcgcttcgcg ggcattaccg cttttgatgt aatcctgata gcctgggatg gcgatgctgg 360
 ccaagatacc cataatggcc accacgacca tgacttctat caggctgaat ccgtactgat 420
 30 ttgaggactt cattatcaaa ccccttttta gatagcctta tcatgcaaac aggcagctgt 480
 catgtccage atcagccgac caatggtcag gattaccoga cgaacggcca aaccactaaa 540
 acgcccagtc actgggtgcca tgagcaactg caggtttaat gataaaatgg cactcaattt 600
 acattggact gtgaacatgt tttcetteta tacgagatta ttggcggttg ccttgetatt 660
 35 ggcacaattg agtgccctgtg gtctcaaagg ggacctgtat attcctgagc gccaatacce 720
 tcaaacgcct caacaagata agtcttcate gtg acc gct ttt tca atc caa caa 774

Val Thr Ala Phe Ser Ile Gln Gln
 1 5

40 ggc cta cta cat gcc gag aat gta gcc ctg cgt gac att gca caa acg 822
 Gly Leu Leu His Ala Glu Asn Val Ala Leu Arg Asp Ile Ala Gln Thr
 10 15 20
 cat caa acg ccc act tac gtc tat tca cgt gcc gcc ttg acg act gct 870
 45 His Gln Thr Pro Thr Tyr Val Tyr Ser Arg Ala Ala Leu Thr Thr Ala
 25 30 35 40

50

ttc gag cgt ttt cag gca ggc ctg act gga cat gac cat ttg atc tgc 918
 Phe Glu Arg Phe Gln Ala Gly Leu Thr Gly His Asp His Leu Ile Cys
 45 50 55
 5 ttt gct gtc aaa gcc aac cca agc ctg gcc att ctc aac ctg ttt gcg 966
 Phe Ala Val Lys Ala Asn Pro Ser Leu Ala Ile Leu Asn Leu Phe Ala
 60 65 70
 10 cga atg gga gcg ggc ttt gat att gtg tcc ggt ggt gag ctg gca cgc 1014
 Arg Met Gly Ala Gly Phe Asp Ile Val Ser Gly Gly Glu Leu Ala Arg
 75 80 85
 15 gtc ttg gcc gca ggt ggc gac ccg aaa aaa gtg gtg ttt tct ggt gtg 1062
 Val Leu Ala Ala Gly Gly Asp Pro Lys Lys Val Val Phe Ser Gly Val
 90 95 100
 20 ggc aaa tcc cat gcg gaa atc aaa gcc gcg ctt gaa gcg ggc att ctt 1110
 Gly Lys Ser His Ala Glu Ile Lys Ala Ala Leu Glu Ala Gly Ile Leu
 105 110 115 120
 25 tgc ttc aac gtg gaa tca gtg aat gag cta gac cgc atc cag cag gtg 1158
 Cys Phe Asn Val Glu Ser Val Asn Glu Leu Asp Arg Ile Gln Gln Val
 125 130 135
 30 gcg gcc agc ctg ggc aaa aaa gcg cct att tcc ctg cgc gtg aac ccc 1206
 Ala Ala Ser Leu Gly Lys Lys Ala Pro Ile Ser Leu Arg Val Asn Pro
 140 145 150
 35 aat gtg gat gcc aaa aca cat ccc tat att tcc cac ccg gct ctc aaa 1254
 Asn Val Asp Ala Lys Thr His Pro Tyr Ile Ser His Pro Ala Leu Lys
 155 160 165
 40 aac aat aaa ttt ggt gtg gca ttt gaa gat gcc ttg ggc ctc tat gaa 1302
 Asn Asn Lys Phe Gly Val Ala Phe Glu Asp Ala Leu Gly Leu Tyr Glu
 170 175 180
 45 aaa gcg gcg caa ctg cca aac atc gag gta cac ggc gta gat tgc cat 1350
 Lys Ala Ala Gln Leu Pro Asn Ile Glu Val His Gly Val Asp Cys His
 185 190 195 200
 50 atc ggc tcg caa atc act gag ctg tca cct ttc ctc gat gcc ttg gat 1398
 Ile Gly Ser Gln Ile Thr Glu Leu Ser Pro Phe Leu Asp Ala Leu Asp
 205 210 215
 55 aaa gta ttg ggc ctg gta gat gca ttg gcc gcc aaa ggc att cat atc 1446
 Lys Val Leu Gly Leu Val Asp Ala Leu Ala Ala Lys Gly Ile His Ile
 220 225 230
 60 cag cat ata gac gtt ggc ggc ggt gtc ggt att act tac agc gac gaa 1494
 Gln His Ile Asp Val Gly Gly Gly Val Gly Ile Thr Tyr Ser Asp Glu

50

	235	240	245	
	acg cca cca gac ttt gca gcc tac act gca gcg att ctt aaa aag ctg			1542
	Thr Pro Pro Asp Phe Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Ile Leu Lys Lys Leu			
5	250	255	260	
	gca ggc agg aat gta aaa gtg ttg ttt gag ccc ggc cgt gcc ctg gtg			1590
	Ala Gly Arg Asn Val Lys Val Leu Phe Glu Pro Gly Arg Ala Leu Val			
	265	270	275	280
10	ggt aac gcc ggt gtg ctg ctg acc aag gtc gaa tac ctg aaa cct ggc			1638
	Gly Asn Ala Gly Val Leu Leu Thr Lys Val Glu Tyr Leu Lys Pro Gly			
	285	290	295	
	gaa acc aaa aac ttt gcg att gtc gat gcc gcc atg aac gac ctc atg			1686
	Glu Thr Lys Asn Phe Ala Ile Val Asp Ala Ala Met Asn Asp Leu Met			
15	300	305	310	
	cgc ccg gct ttg tat gat gct ttc cac aac att acg acc att gcc act			1734
	Arg Pro Ala Leu Tyr Asp Ala Phe His Asn Ile Thr Thr Ile Ala Thr			
	315	320	325	
20	tct gca gcc ccc gca caa atc tat gag atc gtt ggc ccg gtt tgc gag			1782
	Ser Ala Ala Pro Ala Gln Ile Tyr Glu Ile Val Gly Pro Val Cys Glu			
	330	335	340	
	agt ggt gac ttt tta ggc cat gac cgt aca ctt gcg atc gaa gaa ggt			1830
	Ser Gly Asp Phe Leu Gly His Asp Arg Thr Leu Ala Ile Glu Glu Gly			
25	345	350	355	360
	gat tac ctg gcg att cac tcc gca ggc gct tat ggc atg agc atg gcc			1878
	Asp Tyr Leu Ala Ile His Ser Ala Gly Ala Tyr Gly Met Ser Met Ala			
30	365	370	375	
	agc aac tac aac acg cgc gcc cgt gcc gca gag gta ttg gtt gat ggt			1926
	Ser Asn Tyr Asn Thr Arg Ala Arg Ala Ala Glu Val Leu Val Asp Gly			
	380	385	390	
35	gac cag gtg cat gtg atc cgt gaa cgt gaa caa att gcc gac ctg ttt			1974
	Asp Gln Val His Val Ile Arg Glu Arg Glu Gln Ile Ala Asp Leu Phe			
	395	400	405	
40	aaa ctg gag cgt acg ctg cca taacattgac ggcaaccct aataaaaaa			2025
	Lys Leu Glu Arg Thr Leu Pro			
	410	415		
	ccgaagccgc caagcttcgg tttttatta atagcgcac ctttaatcaa agatcacggt			2085
	cttgttcgcg tagagcaaga ttctatgctc aatatgccag cgcacggctt tgaaagcac			2145
	aacacgctcc agtcacggc ctttctggat caggtcttcc acctgatcgc ggtgtgaaat			2205
45	gcgcgcccaag tcttctcaa taatcggccc ctcatccaac acctctgtca cataatgact			2265

50

ggtcgcaccg atcagtttca cgccacgctc aaacgcacgg tggtaaggac gtgcgccgat 2325
 aaatgctggc aggaatgagt ggtggtgaat gttgataatc cgctgaggat accgtgcgac 2385
 aaaatctggt gacagaatct gcatgtagcg tgccagcaca atcagggtcaa tcttggtgtg 2445
 5 atcaaacagg gcaaactgct gngcctctac ctctgccttg gtttaccttg gtcacggta 2505
 aatagtgaaa cgggatgcca taaaactgcg ccagggggat cctctgggtc cccctaaage 2565
 a 2566

<210> 14
 10 <211> 415
 <212> Белок
 <213> Methylophilus methylotrophus

15 <400> 14
 Val Thr Ala Phe Ser Ile Gln Gln Gly Leu Leu His Ala Glu Asn Val
 1 5 10 15
 Ala Leu Arg Asp Ile Ala Gln Thr His Gln Thr Pro Thr Tyr Val Tyr
 20 20 25 30
 Ser Arg Ala Ala Leu Thr Thr Ala Phe Glu Arg Phe Gln Ala Gly Leu
 35 40 45
 Thr Gly His Asp His Leu Ile Cys Phe Ala Val Lys Ala Asn Pro Ser
 25 50 55 60
 Leu Ala Ile Leu Asn Leu Phe Ala Arg Met Gly Ala Gly Phe Asp Ile
 65 70 75 80
 Val Ser Gly Gly Glu Leu Ala Arg Val Leu Ala Ala Gly Gly Asp Pro
 85 90 95
 30 Lys Lys Val Val Phe Ser Gly Val Gly Lys Ser His Ala Glu Ile Lys
 100 105 110
 Ala Ala Leu Glu Ala Gly Ile Leu Cys Phe Asn Val Glu Ser Val Asn
 115 120 125
 35 Glu Leu Asp Arg Ile Gln Gln Val Ala Ala Ser Leu Gly Lys Lys Ala
 130 135 140
 Pro Ile Ser Leu Arg Val Asn Pro Asn Val Asp Ala Lys Thr His Pro
 145 150 155 160
 40 Tyr Ile Ser His Pro Ala Leu Lys Asn Asn Lys Phe Gly Val Ala Phe
 165 170 175
 Glu Asp Ala Leu Gly Leu Tyr Glu Lys Ala Ala Gln Leu Pro Asn Ile
 180 185 190
 45 Glu Val His Gly Val Asp Cys His Ile Gly Ser Gln Ile Thr Glu Leu

50

	195		200		205														
	Ser	Pro	Phe	Leu	Asp	Ala	Leu	Asp	Lys	Val	Leu	Gly	Leu	Val	Asp	Ala			
	210						215					220							
5	Leu	Ala	Ala	Lys	Gly	Ile	His	Ile	Gln	His	Ile	Asp	Val	Gly	Gly	Gly			
	225					230					235					240			
	Val	Gly	Ile	Thr	Tyr	Ser	Asp	Glu	Thr	Pro	Pro	Asp	Phe	Ala	Ala	Tyr			
				245					250					255					
10	Thr	Ala	Ala	Ile	Leu	Lys	Lys	Leu	Ala	Gly	Arg	Asn	Val	Lys	Val	Leu			
				260					265					270					
	Phe	Glu	Pro	Gly	Arg	Ala	Leu	Val	Gly	Asn	Ala	Gly	Val	Leu	Leu	Thr			
			275					280					285						
15	Lys	Val	Glu	Tyr	Leu	Lys	Pro	Gly	Glu	Thr	Lys	Asn	Phe	Ala	Ile	Val			
	290						295					300							
	Asp	Ala	Ala	Met	Asn	Asp	Leu	Met	Arg	Pro	Ala	Leu	Tyr	Asp	Ala	Phe			
	305					310					315					320			
20	His	Asn	Ile	Thr	Thr	Ile	Ala	Thr	Ser	Ala	Ala	Pro	Ala	Gln	Ile	Tyr			
				325						330					335				
	Glu	Ile	Val	Gly	Pro	Val	Cys	Glu	Ser	Gly	Asp	Phe	Leu	Gly	His	Asp			
				340					345				350						
25	Arg	Thr	Leu	Ala	Ile	Glu	Glu	Gly	Asp	Tyr	Leu	Ala	Ile	His	Ser	Ala			
			355					360					365						
	Gly	Ala	Tyr	Gly	Met	Ser	Met	Ala	Ser	Asn	Tyr	Asn	Thr	Arg	Ala	Arg			
			370				375					380							
30	Ala	Ala	Glu	Val	Leu	Val	Asp	Gly	Asp	Gln	Val	His	Val	Ile	Arg	Glu			
			385			390						395				400			
	Arg	Glu	Gln	Ile	Ala	Asp	Leu	Phe	Lys	Leu	Glu	Arg	Thr	Leu	Pro				
				405						410					415				

35

<210> 15

<211> 39

<212> ДНК

40

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> праймер для амплификации промотора tag

45

<400> 15

agggaattcc ccgttctgga taatgtttt tgcgccgac

39

50

<210> 16
 <211> 58
 <212> ДНК
 5 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> праймер для амплификации промотора tag

 10 <400> 16
 cggatgcatc tagagttaac ctgcaggggtg aaattgttat ccgctcacaа ttccacac 58

 15 <210> 17
 <211> 35
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 20 <220>
 <223> праймер для амплификации гена *dapA**24

 25 <400> 17
 tgacctgcag gtttgcacag aggatggccc atggt 35

 <210> 18
 <211> 36
 30 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 35 <220>
 <223> праймер для амплификации гена *dapA**24

 <400> 18
 40 cattctagat ccctaaactt tacagcaaac cggcat 36

 <210> 19
 <211> 35
 45 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 50

<220>

<223> праймер для амплификации гена lysC*80

5

<400> 19

gaacctgcag gccctgacac gaggtagatt atgtc

35

<210> 20

10

<211> 55

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

15

<220>

<223> праймер для амплификации гена lysC*80

<400> 20

20

ctttcggcta gaagagcgag atgcagataa aaaaattaaa ggcaattatt ctccg

55

Формула изобретения

1. Способ получения бактериальных клеток бактерии *Methylophilus* с повышенным содержанием L-аминокислоты, кроме L-глутаминовой кислоты, который включает в себя культивирование бактерии *Methylophilus*, обладающей способностью продуцировать L-аминокислоту, в среде для продуцирования и накопления L-аминокислоты в бактериальных клетках данной бактерии, при котором активность ферментов биосинтеза L-аминокислот у бактерии *Methylophilus* повышена.

2. Способ по п.1, где L-аминокислотой является L-лизин, L-валин, L-лейцин, L-изолейцин или L-треонин.

3. Способ по п.1, где бактерия *Methylophilus* проявляет резистентность к аналогу L-аминокислоты или ауксотрофию по L-аминокислоте.

4. Способ по п.1, при котором у бактерии *Methylophilus* повышена активность дигидродипиколинатсинтазы и активность аспартокиназы и при этом бактерия обладает способностью продуцировать L-лизин.

5. Способ по п.1, при котором у бактерии *Methylophilus* повышена активность дигидродипиколинатсинтазы и при этом бактерия обладает способностью продуцировать L-лизин.

6. Способ по п.1, при котором у бактерии *Methylophilus* повышена активность аспартокиназы и при этом бактерия обладает способностью продуцировать L-лизин.

7. Способ по п.4, при котором активность или активности одного, двух или трех ферментов, выбранных из дегидрогеназы полуальдегида аспарагиновой кислоты, дигидродипиколинатредуктазы и диаминопимелатдекарбоксилазы, у бактерии *Methylophilus* повышена(ы).

8. Способ по п.4, при котором активность дигидродипиколинатсинтазы и активность аспартокиназы у бактерии *Methylophilus* повышена путем трансформации посредством введения в клетки ДНК, кодирующей дигидродипиколинатсинтазу, которая не подвергается ингибированию L-лизином по принципу обратной связи, и ДНК, кодирующей аспартокиназу, которая не подвергается ингибированию L-лизином по принципу обратной связи.

9. Способ по п.1, где активности аспартокиназы, гомосериндегидрогеназы, гомосеринкиназы и треонинсинтазы у бактерии *Methylophilus* повышены и бактерия обладает способностью продуцировать L-треонин.

5 10. Способ по любому из пп.1-9, где бактерией *Methylophilus* является *Methylophilus methylotrophus*.

11. Способ по п.1, при котором среда содержит метанол в качестве основного источника углерода.

10

15

20

25

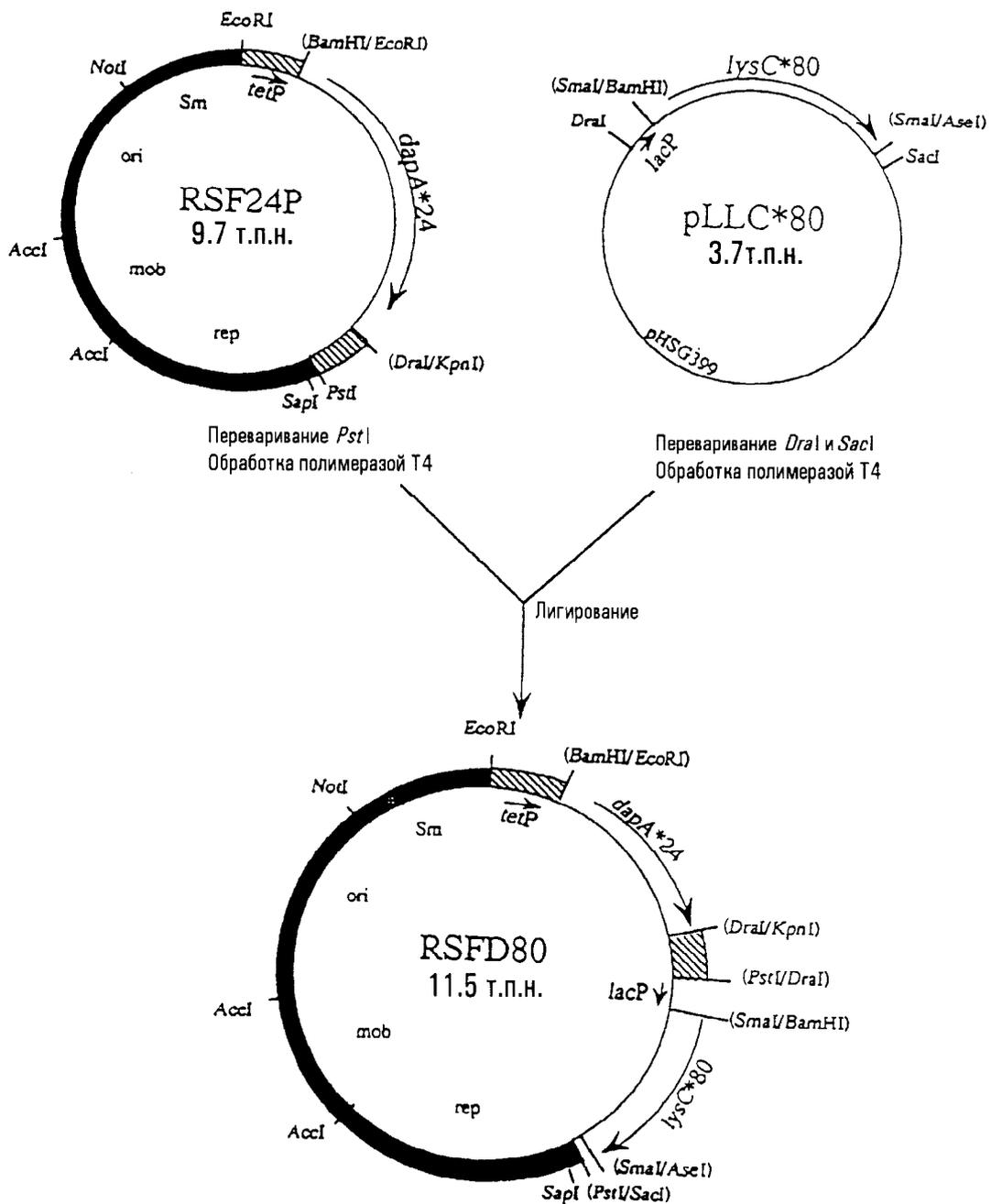
30

35

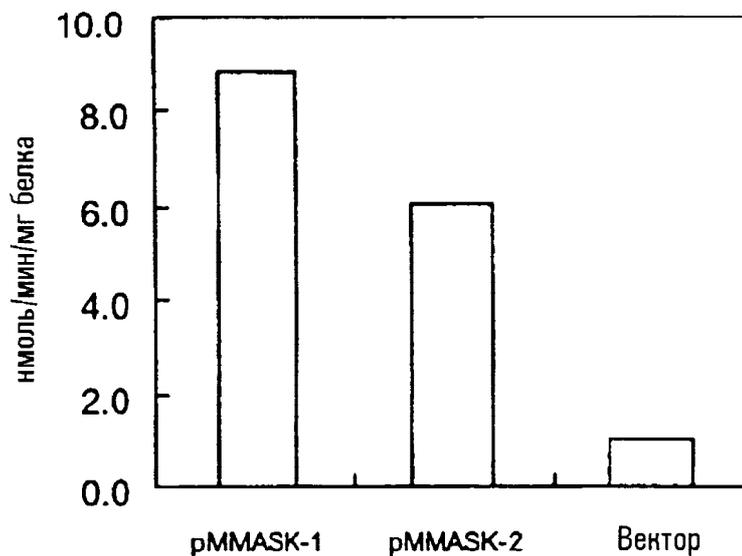
40

45

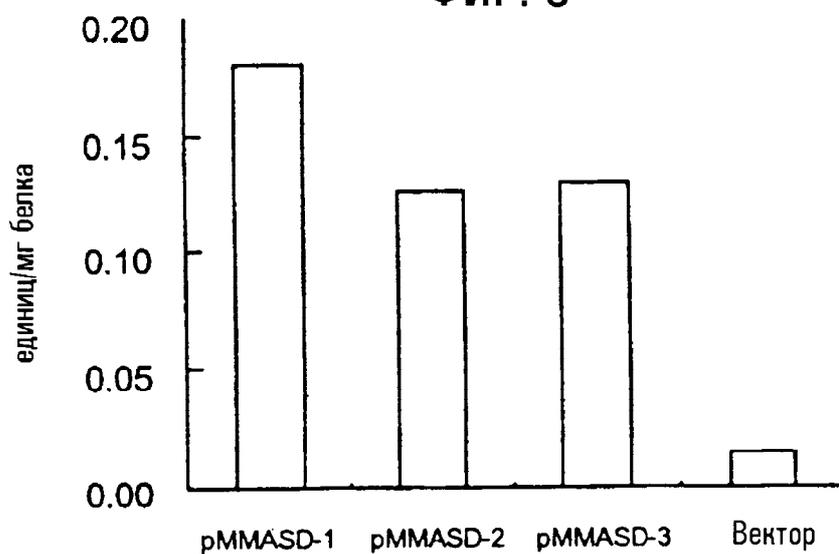
50



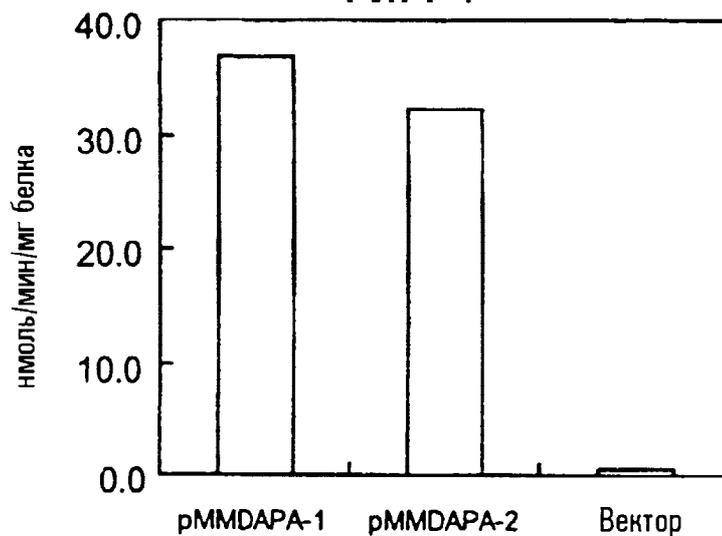
ФИГ. 2



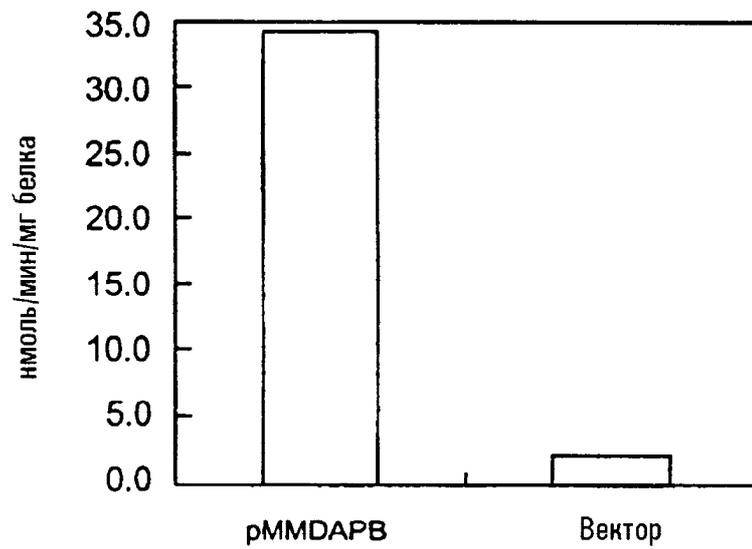
ФИГ. 3



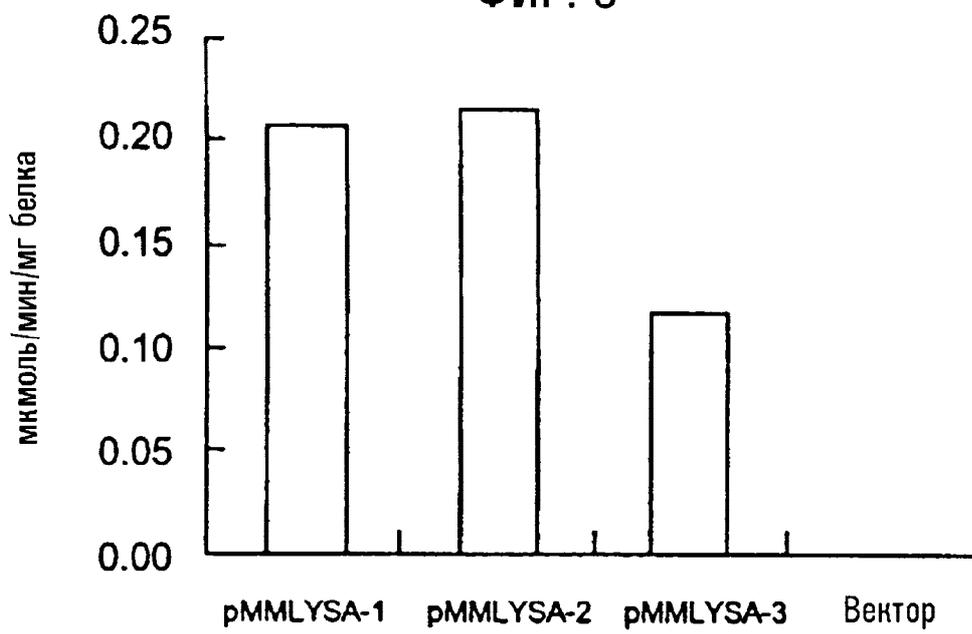
ФИГ. 4



ФИГ. 5



ФИГ. 6



ФИГ. 7