

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7071124号

(P7071124)

(45)発行日 令和4年5月18日(2022.5.18)

(24)登録日 令和4年5月10日(2022.5.10)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/31 (2006.01)

C 1 2 N 15/31

Z N A

C 1 2 N 15/70 (2006.01)

C 1 2 N 15/70

Z

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 1/20 (2006.01)

C 1 2 N 1/20

A

C 1 2 P 13/06 (2006.01)

C 1 2 P 13/06

A

請求項の数 29 (全84頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2017-562747(P2017-562747)

(86)(22)出願日 平成28年6月2日(2016.6.2)

(65)公表番号 特表2018-517413(P2018-517413

A)

(43)公表日 平成30年7月5日(2018.7.5)

(86)国際出願番号 PCT/EP2016/062457

(87)国際公開番号 WO2016/193351

(87)国際公開日 平成28年12月8日(2016.12.8)

審査請求日 令和1年5月30日(2019.5.30)

(31)優先権主張番号 62/171,036

(32)優先日 平成27年6月4日(2015.6.4)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(73)特許権者 508020155

ビーエーエスエフ ソシエタス・ヨーロ

ピア

B A S F S E

ドイツ連邦共和国 6 7 0 5 6 ルードウ

ィヒスハーフェン カール・ボッシュ

- ストラッセ 3 8

(74)代理人 110002572

特許業務法人平木国際特許事務所

(72)発明者 ワン, チンツァオ

アメリカ合衆国 1 0 5 0 2 アーズリー

, プロスペクト アベニュー 1 6

(72)発明者 ラタニ, シャカー シラージ

アメリカ合衆国 1 0 5 2 3 ニューヨー

ク州, エルムスフォード, ノブ ヒルド

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ファインケミカルの生産改善のための組換え微生物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

dadX遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失を含み、かつ、

(a) brnQ遺伝子又はその相同体若しくは機能的変異体の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失、

(b) argP遺伝子又はその相同体若しくは機能的変異体の活性及び/又は発現の導入、増大、増強又は改変、

(c) gcvA遺伝子又はその相同体若しくは機能的変異体の活性及び/又は発現の導入、増大、増強又は改変、

(d) gcvB遺伝子又はその相同体若しくは機能的変異体の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失、或いは

(e)(I) 配列番号49の塩基配列を含む核酸分子、又は

(II) 配列番号49の核酸分子に対して少なくとも90%の同一性を有し、UDP-3-O-(3-ヒドロキシミリストール)グルコサミン-N-アセチルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子、又は

(III) ストリンジェントな条件下で配列番号49の塩基配列を有する核酸分子の相補体にハイブリダイズし、UDP-3-O-(3-ヒドロキシミリストール)グルコサミン-N-アセチルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子、又は

(IV) 配列番号50のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

(V) 配列番号50のポリペプチドに対して少なくとも90%の同一性を有し、UDP-3-O-(3-

ヒドロキシミリストイル)グルコサミン-N-アセチルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子

のうちの少なくとも1つを含む、腸内細菌科 (Enterobacteriaceae) の組換え微生物であって、

前記dadX遺伝子が、以下の核酸分子：

(JJ) 配列番号118の塩基配列を含む核酸分子、又は

(KK) 配列番号118の核酸分子に対して少なくとも90%の同一性を有し、アラニンラセマーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子、又は

(LL) ストリンジェントな条件下で配列番号118の塩基配列を有する核酸分子の相補体にハイブリダイズし、アラニンラセマーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子、又は

10

(MM) 配列番号119のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

(NN) 配列番号119のポリペプチドに対して少なくとも90%の同一性を有し、アラニンラセマーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子、

からなる群より選択されるものであり、

配列番号49の43～45位に対応する(I)～(V)に属する遺伝子のコドンがスレオニンをコードし、又は配列番号50の15位に対応する(I)～(V)に属する遺伝子によりコードされるタンパク質のアミノ酸がスレオニンであり、

さらに、ackA遺伝子、pta遺伝子、adhE遺伝子、frdA遺伝子、pf1B遺伝子、及びldhA遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失を含み、かつ、alaD遺伝子の活性及び/又は発現の導入、増大又は増強を含む、

20

上記組換え微生物。

【請求項2】

brnQ遺伝子が、以下の核酸分子：

(i) 配列番号1の塩基配列を含む核酸分子、又は

(ii) 配列番号1の核酸分子に対して少なくとも90%の同一性を有し、分枝鎖アミノ酸トランスポーター活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子、又は

(iii) ストリンジェントな条件下で配列番号1の塩基配列を有する核酸分子の相補体にハイブリダイズし、分枝鎖アミノ酸トランスポーター活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子、又は

30

(iv) 配列番号2のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

(v) 配列番号2のポリペプチドに対して少なくとも90%の同一性を有し、分枝鎖アミノ酸トランスポーター活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子

の群から選択される、請求項1に記載の組換え微生物。

【請求項3】

argP遺伝子が、以下の核酸分子：

(i) 配列番号45の塩基配列を含む核酸分子、又は

(ii) 配列番号45の核酸分子に対して少なくとも90%の同一性を有し、DNA結合/転写活性化活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子、又は

(iii) ストリンジェントな条件下で配列番号45の塩基配列を有する核酸分子の相補体にハイブリダイズし、DNA結合/転写活性化活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子、又は

40

(iv) 配列番号46のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

(v) 配列番号46のポリペプチドに対して少なくとも90%の同一性を有し、DNA結合/転写活性化活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子

の群から選択される、請求項1に記載の組換え微生物。

【請求項4】

gcvA遺伝子が、以下の核酸分子：

(i) 配列番号53の塩基配列を含む核酸分子、又は

(ii) 配列番号53の核酸分子に対して少なくとも90%の同一性を有し、DNA結合活性を有

50

するポリペプチドをコードする核酸分子、又は
 (iii) ストリンジェントな条件下で配列番号53の塩基配列を有する核酸分子の相補体にハイブリダイズし、DNA結合活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子、又は
 (iv) 配列番号54のポリペプチドをコードする核酸分子、又は
 (v) 配列番号54のポリペプチドに対して少なくとも90%の同一性を有し、DNA結合活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子
 の群から選択される、請求項1に記載の組換え微生物。

【請求項5】

gcvB遺伝子が、以下の核酸分子：

(i) 配列番号58の塩基配列を含む核酸分子、又は
 (ii) 配列番号58の核酸分子に対して少なくとも90%の同一性を有し、非タンパク質コードRNAをコードする核酸分子、又は
 (iii) ストリンジェントな条件下で配列番号58の塩基配列を有する核酸分子の相補体にハイブリダイズし、非タンパク質コードRNAをコードする核酸分子
 の群から選択される、請求項1に記載の組換え微生物。

【請求項6】

ygaW遺伝子の活性及び/又は発現の導入、増大又は増強をさらに含む、請求項1～5のいずれか1項に記載の組換え微生物。

【請求項7】

zipA遺伝子の活性及び/又は発現の導入、増大又は増強をさらに含む、請求項1～6のいずれか1項に記載の組換え微生物。

【請求項8】

lpd遺伝子の活性及び/又は発現の導入、増大又は増強をさらに含む、請求項1～7のいずれか1項に記載の組換え微生物。

【請求項9】

alaD遺伝子が、以下の核酸分子：

(EE) 配列番号15の塩基配列を含む核酸分子、又は
 (FF) 配列番号15の核酸分子に対して少なくとも90%の同一性を有し、アラニンデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子、又は
 (GG) ストリンジェントな条件下で配列番号15の塩基配列を有する核酸分子の相補体にハイブリダイズし、アラニンデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子、又は
 (HH) 配列番号16のポリペプチドをコードする核酸分子、又は
 (II) 配列番号16のポリペプチドに対して少なくとも90%の同一性を有し、アラニンデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子
 からなる群より選択される、請求項1～8のいずれか1項に記載の組換え微生物。

【請求項10】

alaD遺伝子が、配列番号115若しくは116を有するプロモーター、又は以下の核酸分子：

(I) 配列番号115若しくは116の核酸分子に対して少なくとも90%の同一性を有し、プロモーター活性を有する核酸分子、又は
 (II) 高度なストリンジェントな条件下で配列番号115若しくは116の塩基配列を有する核酸分子にハイブリダイズし、プロモーター活性を有する核酸分子、
 に機能可能に連結されている、請求項1～8のいずれか1項に記載の組換え微生物。

【請求項11】

pf1B遺伝子が、以下の核酸分子：

(A) 配列番号5の塩基配列を含む核酸分子、又は
 (B) 配列番号5の核酸分子に対して少なくとも90%の同一性を有しピルビン酸ギ酸リアーゼI活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子、又は
 (C) ストリンジェントな条件下で配列番号5の塩基配列を有する核酸分子の相補体にハイブリダイズしピルビン酸ギ酸リアーゼI活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子、又

10

20

30

40

50

は

(D) 配列番号6のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

(E) 配列番号6のポリペプチドに対して少なくとも90%の同一性を有しピルビン酸ギ酸リアーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子

からなる群より選択される、請求項1~10のいずれか1項に記載の組換え微生物。

【請求項12】

adhE遺伝子が、以下の核酸分子：

(F) 配列番号7の塩基配列を含む核酸分子、又は

(G) 配列番号7の核酸分子に対して少なくとも90%の同一性を有し二機能性アセトアルデヒド-CoAデヒドロゲナーゼ/鉄依存性アルコールデヒドロゲナーゼ/ピルビン酸-ギ酸リアーゼデアクチバーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子、又は

10

(H) ストリンジェントな条件下で配列番号7の塩基配列を有する核酸分子の相補体にハイブリダイズし二機能性アセトアルデヒド-CoAデヒドロゲナーゼ/鉄依存性アルコールデヒドロゲナーゼ/ピルビン酸-ギ酸リアーゼデアクチバーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子、又は

(I) 配列番号8のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

(J) 配列番号8のポリペプチドに対して少なくとも90%の同一性を有し二機能性アセトアルデヒド-CoAデヒドロゲナーゼ/鉄依存性アルコールデヒドロゲナーゼ/ピルビン酸-ギ酸リアーゼデアクチバーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子

からなる群より選択される、請求項1~11のいずれか1項に記載の組換え微生物。

20

【請求項13】

ldhA遺伝子が、以下の核酸分子：

(K) 配列番号9の塩基配列を含む核酸分子、又は

(L) 配列番号9の核酸分子に対して少なくとも90%の同一性を有しNAD依存性発酵性D-乳酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子、又は

(M) ストリンジェントな条件下で配列番号9の塩基配列を有する核酸分子の相補体にハイブリダイズしNAD依存性発酵性D-乳酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子、又は

(N) 配列番号10のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

(O) 配列番号10のポリペプチドに対して少なくとも90%の同一性を有しNAD依存性発酵性D-乳酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子

30

からなる群より選択される、請求項1~12のいずれか1項に記載の組換え微生物。

【請求項14】

pta遺伝子が、以下の核酸分子：

(P) 配列番号11の塩基配列を含む核酸分子、又は

(Q) 配列番号11の核酸分子に対して少なくとも90%の同一性を有しリン酸アセチルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子、又は

(R) ストリンジェントな条件下で配列番号11の塩基配列を有する核酸分子の相補体にハイブリダイズしリン酸アセチルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子、又は

40

(S) 配列番号12のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

(T) 配列番号12のポリペプチドに対して少なくとも90%の同一性を有しリン酸アセチルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子

からなる群より選択される、請求項1~13のいずれか1項に記載の組換え微生物。

【請求項15】

ackA遺伝子が、以下の核酸分子：

(U) 配列番号120の塩基配列を含む核酸分子、又は

(V) 配列番号120の核酸分子に対して少なくとも90%の同一性を有し酢酸キナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子、又は

(W) ストリンジェントな条件下で配列番号120の塩基配列を有する核酸分子の相補体にハ

50

イブリダイズし酢酸キナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子、又は (X) 配列番号121のポリペプチドをコードする核酸分子、又は (Y) 配列番号121のポリペプチドに対して少なくとも90%の同一性を有し酢酸キナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子からなる群より選択される、請求項1~14のいずれか1項に記載の組換え微生物。

【請求項16】

frdA遺伝子が、以下の核酸分子：

(Z) 配列番号13の塩基配列を含む核酸分子、又は (AA) 配列番号13の核酸分子に対して少なくとも90%の同一性を有しフマル酸レダクターゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子、又は (BB) ストリンジェントな条件下で配列番号13の塩基配列を有する核酸分子の相補体にハイブリダイズしフマル酸レダクターゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子、又は (CC) 配列番号14のポリペプチドをコードする核酸分子、又は (DD) 配列番号14のポリペプチドに対して少なくとも90%の同一性を有しフマル酸レダクターゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子からなる群より選択される、請求項1~15のいずれか1項に記載の組換え微生物。

【請求項17】

ygaW遺伝子が、以下の核酸分子：

(OO) 配列番号109の塩基配列を含む核酸分子、又は (PP) 配列番号109の核酸分子に対して少なくとも90%の同一性を有しアラニントランスポーター活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子、又は (QQ) ストリンジェントな条件下で配列番号109の塩基配列を有する核酸分子の相補体にハイブリダイズしアラニントランスポーター活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子、又は (RR) 配列番号110のポリペプチドをコードする核酸分子、又は (SS) 配列番号110のポリペプチドに対して少なくとも90%の同一性を有しアラニントランスポーター活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子からなる群より選択される、請求項6~16のいずれか1項に記載の組換え微生物。

【請求項18】

zipA遺伝子が、以下の核酸分子：

(TT) 配列番号111の塩基配列を含む核酸分子、又は (UU) 配列番号111の核酸分子に対して少なくとも90%の同一性を有しZリングアセンブリに關与する細胞分裂タンパク質活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子、又は (VV) ストリンジェントな条件下で配列番号111の塩基配列を有する核酸分子の相補体にハイブリダイズしZリングアセンブリに關与する細胞分裂タンパク質活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子、又は (WW) 配列番号112のポリペプチドをコードする核酸分子、又は (XX) 配列番号112のポリペプチドに対して少なくとも90%の同一性を有する、Zリングアセンブリに關与する細胞分裂タンパク質活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子からなる群より選択される、請求項7~17のいずれか1項に記載の組換え微生物。

【請求項19】

lpd遺伝子が、以下の核酸分子：

(YY) 配列番号113の塩基配列を含む核酸分子、又は (ZZ) 配列番号113の核酸分子に対して少なくとも90%の同一性を有しリポアミドデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子、又は (AAA) ストリンジェントな条件下で配列番号113の塩基配列を有する核酸分子の相補体にハイブリダイズしリポアミドデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子、又は (BBB) 配列番号114のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

10

20

30

40

50

(CCC) 配列番号114のポリペプチドに対して少なくとも90%の同一性を有しリポアミドデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子からなる群より選択される、請求項8～18のいずれか1項に記載の組換え微生物。

【請求項20】

前記微生物が、コリネバクテリウム属、パチルス属、エルウィニア属、エシェリキア属、パントエア属、ストレプトミセス属、ザイモモナス属、ロドコッカス属及びサッカロミセス属からなる群の属から選択される、請求項1～16のいずれか1項に記載の組換え微生物。

【請求項21】

請求項1～20のいずれか1項に記載の1種以上の組換え微生物を含む組成物。

10

【請求項22】

培地及び炭素源をさらに含む、請求項21に記載の組成物。

【請求項23】

アラニンの産生を可能にする条件下で、請求項1～20のいずれか1項に記載の1種以上の組換え微生物を培養するステップを含む、アラニンの製造方法。

【請求項24】

前記微生物が、0.5%～30%(w/v)の糖を含む培地中で培養される、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

アラニンの収量が少なくとも80%である、請求項23又は24に記載の方法。

20

【請求項26】

L-アラニンのキラル純度が少なくとも95%である、請求項23～25のいずれか1項に記載の方法。

【請求項27】

請求項1～20のいずれか1項に記載の1種以上の遺伝的に改変された微生物を培養培地に接種するステップ及び該培養培地中で該遺伝的に改変された微生物を培養する又は増殖させるステップを含む、遺伝的に改変された微生物を培養する又は増殖させる方法。

【請求項28】

アラニンの発酵生産のための、請求項1～20のいずれか1項に記載の組換え微生物又は請求項21若しくは22に記載の組成物の使用。

30

【請求項29】

以下のステップ：

(I) 発酵槽中で請求項1～20のいずれか1項に記載の微生物を増殖させるステップ、及び

(II) (I)で得られた発酵液から、アラニンを回収するステップ

を含む、アラニンの発酵生産のための方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、組換え核酸分子、組換え微生物、ピルベート、スクシネート、アスパルテート、マレート、ラクテート、バリン、ロイシン及びノ又はアラニンの製造方法、並びにピルベート、スクシネート、アスパルテート、マレート、ラクテート、バリン、ロイシン及びノ又はアラニンの発酵生産のための該組換え核酸分子又は組換え微生物の使用に関する。

40

【背景技術】

【0002】

アミノ酸は、カルボキシ基及びアミノ基を有する有機化合物である。最も重要なアミノ酸は、アミノ基がカルボキシ基の隣に位置しているα-アミノ酸である。タンパク質は、α-アミノ酸に基づいている。

【0003】

アラニンは、食料、飼料及び医薬品産業において添加物として使用されているので、かなりの関心を集めてきた。さらに、アラニンは、強力なキレート剤であるアラニン、N,N-ピ

50

ス(カルボキシメチル)-, 三ナトリウム塩 (MGDA, 商品名Trilon M) の工業生産のための原材料であり、これは有機及び無機規模の溶解に優れた性能を示す (WO94/29421号、WO2012/150155号)。Trilon Mグレードは、標準的なOECD試験において容易に生分解性である。卓越した生態学及び毒物学プロフィールのため、Trilon Mグレードは最終消費者のための製品に使用するのに特に適しており、そのような生分解性複合材料 (complex builders) の要求が常に増加している。

【0004】

アラニンは、コリネ型細菌 (Hermann, 2003: Industrial production of amino acids by Coryneform bacteria, J. of Biotechnol, 104, 155-172) 又は大腸菌 (E.coli.) (WO2007/120198号、WO2008/119009号) を用いる発酵によって生産することができる。

10

【0005】

ygaW遺伝子の過剰発現が微生物の発酵的アラニン生産性を改善することが最近記載されている (WO2012/172822号)。

【0006】

大腸菌におけるアラニン生産はより効率的であり、化学産業のための原材料としてのアラニンの工業生産のために広く使用されている。化学産業によるアラニンの要求が高まっているため、アラニンの発酵生産の生産性の改善の要求もある。

【先行技術文献】

【特許文献】

20

【0007】

【文献】国際公開第WO94/29421号

国際公開第WO2012/150155号

国際公開第WO2007/120198号

国際公開第WO2008/119009号

国際公開第WO2012/172822号

【非特許文献】

【0008】

【文献】Hermann, 2003: Industrial production of amino acids by Coryneform bacteria, J. of Biotechnol, 104, 155-172

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明の目的の1つは、高収量及び高効率でのアラニンの発酵生産に使用することができる微生物を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0010】

上述の目的を達成する貢献は、それぞれの参照微生物と比較して、(i) brnQ遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失、並びに/あるいは(ii) argP遺伝子の活性及び/又は発現の導入、増大又は増強、並びに/あるいは(iii) gcvA遺伝子の活性及び/又は発現の導入、増大又は増強、並びに/あるいは(iv) gcvB遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失、並びに/あるいは(v) lpxD遺伝子の活性の改変、の少なくとも1つを有するエッシェリヒア・コリ (E.コリ、大腸菌) のファミリーの組換え微生物により提供される。

40

【0011】

「酵素の発現及び/又は活性の低減、抑制又は欠失」という用語は、発現及び/又は活性の有意な低減、抑制又は欠失を意味し、またそれぞれの酵素の検出不能な発現及び/又は活性を包含する。

【0012】

例えば酵素の発現及び/若しくは活性、又は収量若しくは生産性を参照して、「より高い

50

」、「増大」又は「増強」という用語は、有意に高い、増大している又は増強されている発現及び/若しくは活性、又は収量若しくは生産性を意味する。

【0013】

酵素の発現及び/又は活性の「改変」という用語は、野生型の非組換え微生物におけるそれぞれの酵素の発現及び/又は活性とは有意に異なる、組換え微生物における酵素の発現及び/又は活性を意味する。

【0014】

予想外にも、(i) brnQ遺伝子によりコードされるタンパク質の発現及び/又は活性の低減、抑制又は欠失、並びに/あるいは(ii) argP遺伝子の活性及び/又は発現の導入、増大又は増強、並びに/あるいは(iii) gcvA遺伝子の活性及び/又は発現の導入、増大又は増強、並びに/あるいは(iv) gcvB遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失、並びに/あるいは(v) lpxD遺伝子の活性の改変、の少なくとも1つを有する微生物が、brnQ遺伝子の発現及び/又は活性の低減、抑制又は欠失、並びに/あるいはargP遺伝子の活性及び/又は発現の導入、増大又は増強、並びに/あるいはgcvA遺伝子の活性及び/又は発現の導入、増大、又は増強、並びに/あるいはgcvB遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失、並びに/あるいはlpxD遺伝子の活性の改変のそれぞれを含まない同じ微生物と比較した場合に、発酵生産における高いアラニンの収量及び/又は生産性を有することを見出した。

【0015】

したがって、目下の本発明の一実施形態は、それぞれの参照微生物と比較して、(i) 分枝鎖アミノ酸トランスポーター活性を有するbrnQタンパク質をコードするbrnQ遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失、並びに/あるいは(ii) DNA結合/転写活性化活性を有するargPタンパク質をコードするargP遺伝子の活性及び/又は発現の導入、増大又は増強、並びに/あるいは(iii) DNA結合タンパク質をコードするgcvA遺伝子の活性及び/又は発現の導入、増大又は増強、並びに/あるいは(iv) 非タンパク質コードRNAをコードするgcvB遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失、並びに/あるいは(v) UDP-3-O-(3-ヒドロキシミリストール)-グルコサミン N-アシルトランスフェラーゼタンパク質をコードするlpxD遺伝子の活性の改変、の少なくとも1つを含み、かつそれぞれの参照微生物と比較して発酵生産におけるアラニンの高い収量及び/又は生産性を有する、組換え微生物である。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1A】ackA-pta遺伝子の不活性化後のクローン検証を示す図である。A：プライマーP395-ackA-pta-check2及びP395-ackA-pta-check5を用いて、大腸菌W ackA-pta::FRTのゲノムDNAから得られたPCRアンプリコン(338bp)。M：DNAサイズマーカー。

【図1B】ackA-pta遺伝子の不活性化後のクローン検証を示す図である。B：P395-ackA-pta-check2及びP395-ackA-pta-check5を用いるPCRアンプリコンの配列決定により、ackA-pta遺伝子座の正確な塩基対での改変を確認した。配列決定により確認されたヌクレオチドは、斜体で示されている。残余のFRT部位は緑色で示され、隣接するプライマー結合部位は赤色で示される。大文字：コード配列。小文字：遺伝子間領域。

【図2A】adhE遺伝子の不活性化後のクローン検証を示す図である。A：プライマーP395-adhE-check2及びP395-adhE-check5を用いて、大腸菌W ackA-pta::FRT adhE::FRTのゲノムDNAから得られたPCRアンプリコン(569bp)。M：DNAサイズマーカー。

【図2B】adhE遺伝子の不活性化後のクローン検証を示す図である。B：P395-adhE-check2及びP395-adhE-check5を用いるPCRアンプリコンの配列決定により、adhE遺伝子座の正確な塩基対での改変を確認した。配列決定により確認されたヌクレオチドは、斜体で示されている。残余のFRT部位は緑色で示され、隣接するプライマー結合部位は赤色で示される。大文字：コード配列。小文字：遺伝子間領域。

【図3A】frdABCD遺伝子の不活性化後のクローン検証を示す図である。A：プライマー

P395-frd-check1及びP395-frd-check4を用いて、大腸菌W ackA-pta::FRT adhE::FRT frdABCD::FRTのゲノムDNAから得られたPCRアンプリコン(797bp)。M: DNAサイズマーカー。

【図3B】frdABCD遺伝子の不活性化後のクローン検証を示す図である。B: P395-frd-check1及びP395-frd-check4を用いるPCRアンプリコンの配列決定により、frd遺伝子座の正確な塩基対での改変を確認した。配列決定により確認されたヌクレオチドは、斜体で示されている。残余のFRT部位は緑色で示され、隣接するプライマー結合部位は赤色で示される。大文字: コード配列。小文字: 遺伝子間領域。

【図4A】pflB遺伝子の不活性化後のクローン検証を示す図である。A: プライマーP395-pflB-check1及びP395-pflB-check3を用いて、大腸菌W ackA-pta::FRT adhE::FRT frdABCD::FRT pflB::FRTのゲノムDNAから得られたPCRアンプリコン(511bp)。M: DNAサイズマーカー。

10

【図4B】pflB遺伝子の不活性化後のクローン検証を示す図である。B: P395-pflB-check1及びP395-pflB-check3を用いるPCRアンプリコンの配列決定により、pflB遺伝子座の正確な塩基対での改変を確認した。配列決定により確認されたヌクレオチドは、斜体で示されている。残余のFRT部位は緑色で示され、隣接するプライマー結合部位は赤色で示される。大文字: コード配列。小文字: 遺伝子間領域。

【図5A】alaD-gstear遺伝子の組み込み後のクローン検証を示す図である。A: プライマーP395-ldhA-check1及びP395-ldhA-check2を用いて、大腸菌W ackA-pta::FRT adhE::FRT frdABCD::FRT pflB::FRT ldhA::alaD-gstearのゲノムDNAから得られたPCRアンプリコン(1833bp)。M: DNAサイズマーカー。

20

【図5B】alaD-gstear遺伝子の組み込み後のクローン検証を示す図である。B: P395-ldhA-check1及びP395-ldhA-check2を用いるPCRアンプリコンの配列決定により、ldhA遺伝子座の正確な塩基対での改変及びalaD-gstearの組み込みを確認した。配列決定により確認されたヌクレオチドは、斜体で示されている。alaD-gstear ORFはシアン色で示され、残余のFRT部位は緑色で示され、隣接するプライマー結合部位は赤色で示される。大文字: コード配列。小文字: 遺伝子間領域。

【図6】本発明の微生物におけるアラニン合成の代謝マップを示す図である。赤色星は酵素活性のノックアウトを示す。緑色矢印は導入された酵素活性を示す。J7はldh - 乳酸デヒドロゲナーゼを表し、KOによりラクテートの産生が低減する。J6はfrdABCD - フマル酸レダクターゼを表し、KOによりスクシネートの産生が低減する。J8はpfl - ピルビン酸ギ酸リアーゼを表し、KOによりアセテート及びエタノールの産生が低減する。J10はack-pta - ホスホトランスアセチラーゼ-酢酸キナーゼを表し、KOによりアセテートの産生が低減する。J11はadhE - アルコールデヒドロゲナーゼを表し、KOによりエタノールの産生が低減する。

30

【図7】140g/Lグルコースを含む500mL AM 1培地中での大腸菌QZ20株及び大腸菌QZ48株(ArgP A96E)のバッチ発酵の間のアラニン形成を示す図である。発酵は、通気なしで、5N NH₄OHを用いてpH6.8にて、37℃、400rpmで制御した。

【図8】炭素源として140g/Lグルコースを含む500mL AM 1培地中でのバッチ発酵の46時間後の、大腸菌QZ20株及びQZ48株(ArgP A96E)の、反応器容量及び時間により除算した生成産物量として定義される体積測定アラニン生産性(空時収量)を示す図である。

40

【図9】140g/Lグルコースを含む500mL AM 1培地中での大腸菌QZ20/pACYC184株プラスミド対照及び大腸菌QZ20/pACYC184-argP株のバッチ発酵の間のアラニン形成を示す図である。発酵は、通気なしで、5N NH₄OHを用いてpH6.8にて、37℃、400rpmで制御した。

【図10】炭素源として140g/Lグルコースを含む500mL AM 1培地中でのバッチ発酵の20時間後の、大腸菌QZ20/pACYC184株プラスミド対照及び大腸菌QZ20/pACYC184-argP株の、反応器容量及び時間により除算した生成産物量として定義される体積測定アラニン生産性(空時収量)を示す図である。

50

【図11】140g/Lグルコースを含む500mL AM 1培地中での大腸菌QZ20株及び大腸菌QZ58株 (gcvA/BプロモーターSNP) のバッチ発酵の間のアラニン形成を示す図である。発酵は、通気なしで、5N NH₄OHを用いてpH6.8にて、37℃、400rpmで制御した。

【図12】炭素源として140g/Lグルコースを含む500mL AM 1培地中でのバッチ発酵の46時間後の、大腸菌QZ20株及びQZ58株 (gcvA/BプロモーターSNP) の、反応器容量及び時間により除算した生成産物量として定義される体積測定アラニン生産性 (空時収量) を示す図である。

【図13】140g/Lグルコースを含む500mL AM 1培地中での大腸菌QZ48株 (ArgP A96E) 及び大腸菌QZ66株 (Arg A96E, gcvA/BプロモーターSNP) のバッチ発酵の間のアラニン形成を示す図である。発酵は、通気なしで、5N NH₄OHを用いてpH6.8にて、37℃、400rpmで制御した。

10

【図14】炭素源として140g/Lグルコースを含む500mL AM 1培地中でのバッチ発酵の46時間後の、大腸菌QZ48株 (ArgP A96E) 及び大腸菌QZ66株 (ArgP A96E, gcvA/BプロモーターSNP) の、反応器容量及び時間により除算した生成産物量として定義される体積測定アラニン生産性 (空時収量) を示す図である。

【図15】大腸菌QZ20株 (8時間) と比較した、バッチ発酵の8時間、11時間及び28時間での大腸菌QZ20株及びQZ23株での (A) gcvA及び (B) gcvBの相対的遺伝子転写分析を示す図である。すべてのqPCR由来データは、参照としてのrrsA遺伝子に対して正規化した。

【図16】140g/Lグルコースを含む500mL AM 1培地中での大腸菌QZ20/pACYC184株プラスミド対照、大腸菌QZ20/pACYC184-gcvA株及び大腸菌QZ20/pACYC184-gcvB株のバッチ発酵の間のアラニン形成を示す図である。発酵は、通気なしで、5N NH₄OHを用いてpH6.8にて、37℃、400rpmで制御した。

20

【図17】炭素源として140g/Lグルコースを含む500mL AM 1培地中でのバッチ発酵の46時間後の、プラスミド対照pACYC184、pACYC184-gcvA及びpACYC184-gcvBを有する大腸菌QZ20株の、反応器容量及び時間により除算した生成産物量として定義される体積測定アラニン生産性 (空時収量) を示す図である。

【図18】140g/Lグルコースを含む500mL AM 1培地中での大腸菌QZ20株及び大腸菌QZ71株 (gcvBノックアウト) のバッチ発酵の間のアラニン形成を示す図である。発酵は、通気なしで、5N NH₄OHを用いてpH6.8にて、37℃、400rpmで制御した。

30

【図19】炭素源として140g/Lグルコースを含む500mL AM 1培地中でのバッチ発酵の46時間後の、大腸菌QZ20株及び大腸菌QZ71株 (gcvBノックアウト) の、反応器容量及び時間により除算した生成産物量として定義される体積測定アラニン生産性 (空時収量) を示す図である。

【図20】140g/Lグルコースを含む500mL AM 1培地中での大腸菌QZ20株、大腸菌QZ57株 (brnQ 667-764) 及び大腸菌QZ69株 (brnQ KO) のバッチ発酵の間のアラニン形成を示す図である。発酵は、通気なしで、5N NH₄OHを用いてpH6.8にて、37℃、400rpmで制御した。

【図21】炭素源として140g/Lグルコースを含む500mL AM 1培地中でのバッチ発酵の46時間後の、大腸菌QZ20株、大腸菌QZ57株 (brnQ 667-764) 及び大腸菌QZ69株 (brnQ KO) の、反応器容量及び時間により除算した生成産物量として定義される体積測定アラニン生産性 (空時収量) を示す図である。

40

【図22】140g/Lグルコースを含む500mL AM 1培地中での大腸菌QZ20株及び大腸菌QZ56株 (LpxD A15T) のバッチ発酵の間のアラニン形成を示す図である。発酵は、通気なしで、5N NH₄OHを用いてpH6.8にて、37℃、400rpmで制御した。

【図23】炭素源として140g/Lグルコースを含む500mL AM 1培地中でのバッチ発酵の46時間後の、大腸菌QZ20株及び大腸菌QZ56株 (LpxD A15T) の、反応器容量及び時間により除算した生成産物量として定義される体積測定アラニン生産性 (空時収量) を示す図である。

【図24】140g/Lグルコースを含む500mL AM 1培地中での大腸菌QZ68株 (argP A9

50

6E, gcvA/Bプロモーター-SNP, brnQ 667-764) 及び大腸菌QZ70株 (argP A96E, gcvA/Bプロモーター-SNP, brnQ 667-764, lpxD A15T) のバッチ発酵の間のアラニン形成を示す図である。発酵は、通気なしで、5N NH₄OHを用いてpH6.8にて、37、400rpmで制御した。

【図25】炭素源として140g/Lグルコースを含む500mL AM 1培地中でのバッチ発酵の46時間後の、大腸菌QZ68株 (argP A96E, gcvA/Bプロモーター-SNP, brnQ 667-764) 及び大腸菌QZ70株 (argP A96E, gcvA/Bプロモーター-SNP, brnQ 667-764, lpxD A15T) の、反応器容量及び時間により除算した生成産物量として定義される体積測定アラニン生産性(空時収量)を示す図である。

【図26】炭素源として140g/Lグルコースを含む500mL AM 1培地中でのバッチ発酵の間の様々な時点で大腸菌QZ30株及び大腸菌QZ23株から採取したアラニンサンプルの鏡像体過剰率を示す図である。発酵は、通気なしで、5N NH₄OHを用いてpH6.8にて、37、400rpmで制御した。

【発明を実施するための形態】

【0017】

本明細書において使用する「参照微生物」という用語は、組換え微生物を比較する対照の微生物を意味する。この参照微生物は、分析しようとする相違点を除いて組換え微生物と実質的に同じ遺伝子型を有する。好ましくは、参照微生物は、組換え微生物が由来する菌株である。例えば、ある遺伝子が野生型微生物に導入され、組換え微生物が作出されていれば、野生型がこの組換え微生物のために好適な参照微生物となるだろう。また、組換え微生物Aにさらなる変異が導入され、それにより組換え微生物Bを作出することも可能である。その場合、組換え微生物Aは、組換え微生物Bのために好適な参照微生物となりうる。結果的に、組換え微生物及びそれぞれの参照微生物の性能は、実質的に同じ条件下で増殖させた両微生物で比較しうる。

【0018】

当業者には、アラニンの収量及び/又は生産性の増大を有する微生物はまた、アラニンに近縁の他の代謝産物、例えばアラニン経路における中間体である代謝産物、アラニン経路と共通の中間体を有する代謝産物、又はそれらの経路における中間体としてアラニンを利用する代謝産物の製造に用いることができることが自明である。本発明の微生物はまた、特定の酵素活性の増大若しくは導入により、又は特定の酵素活性のノックアウト若しくは低減により、そのような関連する代謝産物の収量及び/又は生産性の増大を有するために容易に適合させることができる。

【0019】

かかる代謝産物は、例えば、ピルベート、スクシネート、アスパルテート、マレート、ラクテート、バリン及びロイシンである。

【0020】

例えば、本発明の組換え微生物を使用してスクシネートを製造するために、本発明の微生物のゲノムにおいて、遺伝子ldh、pfl、pta及びadhEをノックアウトする必要があり、かつPEPカルボキシラーゼ遺伝子及び/又はピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子を導入する必要がある。それぞれの経路及び必要な変異は、例えばZhang et al. (2009), PNAS (106) pp20180-20185に記載されている。

【0021】

したがって、目下の本発明の別の実施形態は、それぞれの参照微生物と比較して、(i) 分枝鎖アミノ酸トランスポーター活性を有するbrnQタンパク質をコードするbrnQ遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失、並びに/あるいは(ii) DNA結合/転写活性化活性を有するargPタンパク質をコードするargP遺伝子の活性及び/又は発現の導入、増大又は増強、並びに/あるいは(iii) DNA結合タンパク質をコードするgcvA遺伝子の活性及び/又は発現の導入、増大又は増強、並びに/あるいは(iv) 非タンパク質コードRNAをコードするgcvB遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失、並びに/あるいは(v) UDP-3-O-(3-ヒドロキシミリストール)-グルコサミン N-アシルトランスフェラ

10

20

30

40

50

ーゼタンパク質をコードするIpxD遺伝子の活性の改変、の少なくとも1つを含み、かつそれぞれの参照微生物と比較して発酵生産におけるピルベート、スクシネート、アスパルテート、マレート、ラクテート、バリン及び/又はロイシンの高い収量及び/又は生産性を有する、組換え微生物である。

【0022】

いくつかの実施形態において、微生物は原核細胞又は酵母細胞である。好適な原核細胞としては、グラム陽性菌、グラム陰性菌及びグラム不定性菌細胞、好ましくはグラム陰性菌が挙げられる。

【0023】

したがって、本発明において使用することができる微生物には、限定されるものではないが、グルコノバクター・オキシダンス (*Gluconobacter oxydans*)、グルコノバクター・アサイイ (*Gluconobacter asaii*)、アクロモバクター・デルマルヴァエ (*Achromobacter delmarvae*)、アクロモバクター・ヴィスコサス (*Achromobacter viscosus*)、

アクロモバクター・ラクチカム (*Achromobacter lacticum*)、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*)、アグロバクテリウム・ラディオバクテリウム (*Agrobacterium radiobacter*)、アルカリゲネス・フェカリス (*Alcaligenes faecalis*)、アルスロバクター・シトレウス (*Arthrobacter citreus*)、アルスロバクター・ツメセンス (*Arthrobacter tumescens*)、アルスロバクター・パラフィネウス (*Arthrobacter paraffineus*)、アルスロバクター・ヒドロカルボグルタミカス (*Arthrobacter hydrocarboglutamicus*)、アルスロバクター・オキシダンス (*Arthrobacter oxydans*)、アウレオバクテリウム・サペルダエ (*Aureobacterium saperdae*)、アゾトバクター・インディカス (*Azotobacter indicus*)、プレビバクテリウム・アンモニアゲネス (*Brevibacterium ammoniagenes*)、プレビバクテリウム・ディバリカタム (*Brevibacterium divaricatum*)、プレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム (*Brevibacterium lactofermentum*)、プレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*)、プレビバクテリウム・グロボサム (*Brevibacterium globosum*)、プレビバクテリウム・フスカム (*Brevibacterium fuscum*)、プレビバクテリウム・ケトグルタミカム (*Brevibacterium ketoglutamicum*)、プレビバクテリウム・ヘルコラム (*Brevibacterium helcolum*)、プレビバクテリウム・プシラム (*Brevibacterium pusillum*)、

プレビバクテリウム・テストセウム (*Brevibacterium testaceum*)、プレビバクテリウム・ロセウム (*Brevibacterium roseum*)、プレビバクテリウム・イマリオフィラム (*Brevibacterium immariophilium*)、プレビバクテリウム・リネンス (*Brevibacterium linens*)、プレビバクテリウム・プロトファルミエ (*Brevibacterium protopharmiae*)、コリネバクテリウム・アセトフィラム (*Corynebacterium acetophilum*)、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*)、コリネバクテリウム・カルナエ (*Corynebacterium callunae*)、コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム (*Corynebacterium acetoacidophilum*)、コリネバクテリウム・アセトグルタミカム (*Corynebacterium acetoglutamicum*)、エンテロバクター・アエロゲネス (*Enterobacter aerogenes*)、エルウィニア・アミロボーラ (*Erwinia amylovora*)、エルウィニア・カロトボーラ (*Erwinia carotovora*)、エルウィニア・ヘルビコーラ (*Erwinia herbicola*)、エルウィニア・クリサンテム (*Erwinia chrysanthemi*)、フラボバクテリウム・ペレグリナム (*Flavobacterium peregrinum*)、フラボバクテリウム・フカツム (*Flavobacterium fucatum*)、フラボバクテリウム・アウランティナム (*Flavobacterium aurantinum*)、フラボバクテリウム・レナム (*Flavobacterium rhenanum*)、フラボバクテリウム・セワネンセ (*Flavobacterium sewanense*)、フラボバクテリウム・ブレーベ (*Flavobacterium breve*)、フラボバクテリウム・メニンゴセプティカム (*Flavobacterium meningosepticum*)、マイクロコッカス・エスピー (*Micrococcus* sp.) CCM825、モルガネラ・モルガニイ (*Morganella morganii*)、ノカルジア・オパカ (*Nocardia opaca*)、ノカルジア・ルゴサ (*Nocardia rugosa*)、プラノコッカス・ユーシナタス (*Planococcus eucinatus*)、プロテウス・レッゲリ (*Proteus* sp.)

10

20

30

40

50

us rettgeri)、プロピオニバクテリウム・シャーemani (Propionibacterium shermanii)、シュードモナス・シンキサクタ (Pseudomonas synxantha)、シュードモナス・アゾトフォルマンズ (Pseudomonas azotoformans)、シュードモナス・フルオレッセンス (Pseudomonas fluorescens)、シュードモナス・オバリス (Pseudomonas ovalis)、シュードモナス・スタツツェリ (Pseudomonas stutzeri)、シュードモナス・アシドボランス (Pseudomonas acidovorans)、シュードモナス・ムシドレンス (Pseudomonas mucidolens)、シュードモナス・テストステロニ (Pseudomonas testosteroni)、シュードモナス・アエルギノサ (Pseudomonas aeruginosa)、ロドコッカス・エリスロポリス (Rhodococcus erythropolis)、ロドコッカス・ロドクラウス (Rhodococcus rhodochrous)、ロドコッカス・エスピー (Rhodococcus sp.) ATCC 15592、ロドコッカス・エスピー (Rhodococcus sp.) ATCC 19070、スポロサルシナ・ウレエ (Sporosarcina ureae)、スタフィロコッカス・アウレウス (Staphylococcus aureus)、ビブリオ・メチニコフイ (Vibrio metschnikovii)、ビブリオ・チロゲネス (Vibrio tyrogensis)、アクチノマデュラ・マデュレ (Actinomadura madurae)、アクチノマイセス・ビオラセオクロモゲネス (Actinomyces violaceochromogenes)、キタサトスポリア・パルロサ (Kitasatosporia parulosa)、ストレプトマイセス・アベルミティリス (Streptomyces avermitilis)、ストレプトマイセス・コエリコロール (Streptomyces coelicolor)、ストレプトマイセス・フラベラス (Streptomyces flavelus)、ストレプトマイセス・グリセオラス (Streptomyces griseolus)、ストレプトマイセス・リビダンス (Streptomyces lividans)、ストレプトマイセス・オリバセウス (Streptomyces olivaceus)、ストレプトマイセス・タナシエンシス (Streptomyces tanshiensis)、ストレプトマイセス・バージニエ (Streptomyces virginiae)、ストレプトマイセス・アンチバイオチクス (Streptomyces antibioticus)、ストレプトマイセス・カカオイ (Streptomyces cacaoi)、ストレプトマイセス・ラベンデュレ (Streptomyces lavendulae)、ストレプトマイセス・ビロドクロモゲネス (Streptomyces viridochromogenes)、アエロモナス・サルモニシダ (Aeromonas salmonicida)、バチルス・プミルス (Bacillus pumilus)、バチルス・サーキュランズ (Bacillus circulans)、バチルス・チアミノリティカス (Bacillus thiaminolyticus)、エシェリキア・フロインディイ (Escherichia freundii)、マイクロバクテリウム・アンモニアフィラム (Microbacterium ammoniaphilum)、セラチア・マルセッセンス (Serratia marcescens)、サルモネラ・チフィムリウム (Salmonella typhimurium)、サルモネラ・ショットムレリ (Salmonella schottmulleri)、ザントモナス・シトリ (Xanthomonas citri) などが含まれる。

【0024】

いくつかの実施形態において、微生物は真核細胞である。好適な真核細胞としては、酵母細胞、例えば、サッカロミセス (Saccharomyces) 種、例えばサッカロミセス・セレビスエ (Saccharomyces cerevisiae)、ハンセヌラ (Hansenula) 種、例えばハンセヌラ・ポリモルファ (Hansenula polymorpha)、シゾサッカロミセス (Schizosaccharomyces) 種、例えばシゾサッカロミセス・ポンベ (Schizosaccharomyces pombe)、クルイベロミセス (Kluyveromyces) 種、例えばクルイベロミセス・ラクチス (Kluyveromyces lactis) 及びクルイベロミセス・マルキシアナス (Kluyveromyces marxianus)、ヤロウシア (Yarrowia) 種、例えばヤロウシア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica)、ピヒア (Pichia) 種、例えばピヒア・メタノリカ (Pichia methanolica)、ピヒア・スティピテス (Pichia stipites) 及びピヒア・パストリス (Pichia pastoris)、ジゴサッカロミセス (Zygosaccharomyces) 種、例えばジゴサッカロミセス・ルキシー (Zygosaccharomyces rouxii) 及びジゴサッカロミセス・バイリイ (Zygosaccharomyces bailii)、カンジダ (Candida) 種、例えばカンジダ・ボイジニイ (Candida boidinii)、カンジダ・ユティリス (Candida utilis)、カンジダ・フレイシュシイ (Candida freyschussii)、カンジダ・グラブラータ (Candida glabrata) 及びカンジダ・ソノレンシス (Candida sonorensis)、シュワンニオミセス (Schwanniomyces) 種、例えばシ

10

20

30

40

50

ユワンニオミセス・オクシデンタリス (*Schwanniomyces occidentalis*)、アルクスラ (*Arxula*) 種、例えばアルクスラ・アデニニボランス (*Arxula adenivorans*)、オガタエア (*Ogataea*) 種、例えばオガタエア・ミヌータ (*Ogataea minuta*)、クレブシエラ (*Klebsiella*) 種、例えばクレブシエラ・ニューモニア (*Klebsiella pneumonia*) が挙げられる。

【 0 0 2 5 】

多数の工業用細菌株が本明細書に開示される方法に使用するために特に好適である。いくつかの実施形態において、微生物は、コリネバクテリウム属 (*Corynebacterium*) の種、例えば *C.アセトフィラム* (*C. acetophilum*)、*C.グルタミカム* (*C. glutamicum*)、*C.カルナエ* (*C. callunae*)、*C.アセトアシドフィラム* (*C. acetoacidophilum*)、*C.アセトグルタミカム* (*C. aceto-glutamicum*) である。いくつかの実施形態において、微生物は、バチルス (*Bacillus*) 属の種、例えば *B.チューリングェンシス* (*B. thuringiensis*)、*B.アントラシス* (*B. anthracis*)、*B.メガテリウム* (*B. megaterium*)、*B.ズブチリス* (*B. subtilis*)、*B.レンティルス* (*B. lentils*)、*B.サーキュランス* (*B. circulans*)、*B.プミルス* (*B. pumilus*)、*B.ラウタス* (*B. lautus*)、*B.コアギュランス* (*B. coagulans*)、*B.ブレビス* (*B. brevis*)、*B.フィルムス* (*B. firmus*)、*B.アルカオフィウス* (*B. alkaophilus*)、*B.リケニフォルミス* (*B. licheniformis*)、*B.クラウシイ* (*B. clausii*)、*B.ステアロサーモフィルス* (*B. stearothermophilus*)、*B.ハロデュランス* (*B. halodurans*)、*B.ズブチリス* (*B. subtilis*)、*B.プミルス* (*B. pumilus*)、及び *B.アミロリケファシエンス* (*B. amyloliquefaciens*) である。いくつかの実施形態において、微生物は、エルウィニア (*Erwinia*) 属の種、例えば *E.ウレドボラ* (*E. uredovora*)、*E.カロトボラ* (*E. carotovora*)、*E.アナナス* (*E. ananas*)、*E.ヘルビコーラ* (*E. herbicola*)、*E.プンクタータ* (*E. punctata*) 及び *E.テレウス* (*E. terreus*) である。いくつかの実施形態において、微生物は、エシェリキア (*Escherichia*) 属の種、例えば大腸菌 (*E. coli*) である。他の実施形態において、微生物は、パントエア (*Pantoea*) 属の種、例えば *P.シトレア* (*P. citrea*) 又は *P.アグロメランス* (*P. agglomerans*) である。また他の実施形態において、微生物は、ストレプトミセス (*Streptomyces*) 属の種、例えば *S.アムボファシエンス* (*S. ambofaciens*)、*S.アクロモゲネス* (*S. achromogenes*)、*S.アヴェルミティリス* (*S. avermitilis*)、*S.コエリコロル* (*S. coelicolor*)、*S.アウレオファシエンス* (*S. aureofaciens*)、*S.アウレウス* (*S. aureus*)、*S.フンギシディカス* (*S. fungicidicus*)、*S.グリセウス* (*S. griseus*) 又は *S.リビダンス* (*S. lividans*) である。さらなる実施形態において、微生物は、ザイモモナス (*Zymomonas*) 属の種、例えば *Z.モビリス* (*Z. mobilis*) 又は *Z.リポリティカ* (*Z. lipolytica*) である。さらなる実施形態において、微生物は、ロドコッカス (*Rhodococcus*) 属の種、例えば *R.オパカス* (*R. opacus*) である。

【 0 0 2 6 】

好ましくは、微生物は、腸内細菌科 (*Enterobacteriaceae*) から選択され、好ましくはエシェリキア属 (*Escherichia*)、例えば大腸菌 (*E. coli*)、好ましくは DSMZ 1116 に相当する大腸菌 W 株 (ATCC9637 に相当) である。

【 0 0 2 7 】

分枝鎖アミノ酸トランスポーター活性を有する brnQ タンパク質をコードする brnQ 遺伝子の活性及び / 又は発現の低減、抑制又は欠失、並びに / あるいは DNA 結合 / 転写活性化活性を有する argP タンパク質をコードする argP 遺伝子の活性及び / 又は発現の導入、増大又は増強、並びに / あるいは DNA 結合タンパク質をコードする gcvA 遺伝子の活性及び / 又は発現の導入、増大又は増強、並びに / あるいは非タンパク質コード RNA をコードする gcvB 遺伝子の活性及び / 又は発現の低減、抑制又は欠失、並びに / あるいは UDP-3-O-(3-ヒドロキシミリストイル)-グルコサミン N-アシルトランスフェラーゼタンパク質をコードする lpxD 遺伝子の活性の改変に加えて、本発明の組換え微生物は、(a) ピルビン酸ギ酸リアーゼをコードする pf1B 遺伝子の活性及び / 又は発現の低減、抑制又は欠失 (ここで pf1B 遺伝子の活性及び / 又は発現の低減、抑制又は欠失は、それぞれの参照微生物と比較

10

20

30

40

50

して決定される)をさらに含んでもよい。

【0028】

分枝鎖アミノ酸トランスポーター活性を有するbrnQタンパク質をコードするbrnQ遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失、並びに/あるいはDNA結合/転写活性化活性を有するargPタンパク質をコードするargP遺伝子の活性及び/又は発現の導入、増大又は増強、並びに/あるいはDNA結合タンパク質をコードするgcvA遺伝子の活性及び/又は発現の導入、増大又は増強、並びに/あるいは非タンパク質コードRNAをコードするgcvB遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失、並びに/あるいはUDP-3-O-(3-ヒドロキシミリストール)-グルコサミン N-アシルトランスフェラーゼタンパク質をコードするlpxD遺伝子の活性の改変に加えて、本発明の組換え微生物は、(b)二官能性アセトアルデヒド-CoAデヒドロゲナーゼ/鉄依存性アルコールデヒドロゲナーゼ/ピルビン酸-ギ酸リアーゼデアクチパーゼをコードするadhE遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失(ここでadhE遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失は、それぞれの参照微生物と比較して決定される)をさらに含んでもよい。

10

【0029】

分枝鎖アミノ酸トランスポーター活性を有するbrnQタンパク質をコードするbrnQ遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失、並びに/あるいはDNA結合/転写活性化活性を有するargPタンパク質をコードするargP遺伝子の活性及び/又は発現の導入、増大又は増強、並びに/あるいはDNA結合タンパク質をコードするgcvA遺伝子の活性及び/又は発現の導入、増大又は増強、並びに/あるいは非タンパク質コードRNAをコードするgcvB遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失、並びに/あるいはUDP-3-O-(3-ヒドロキシミリストール)-グルコサミン N-アシルトランスフェラーゼタンパク質をコードするlpxD遺伝子の活性の改変に加えて、本発明の組換え微生物は、(c)NAD依存性発酵性D-乳酸デヒドロゲナーゼをコードするldhA遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失(ここでldhA遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失は、それぞれの参照微生物と比較して決定される)をさらに含んでもよい。

20

【0030】

分枝鎖アミノ酸トランスポーター活性を有するbrnQタンパク質をコードするbrnQ遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失、並びに/あるいはDNA結合/転写活性化活性を有するargPタンパク質をコードするargP遺伝子の活性及び/又は発現の導入、増大又は増強、並びに/あるいはDNA結合タンパク質をコードするgcvA遺伝子の活性及び/又は発現の導入、増大又は増強、並びに/あるいは非タンパク質コードRNAをコードするgcvB遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失、並びに/あるいはUDP-3-O-(3-ヒドロキシミリストール)-グルコサミン N-アシルトランスフェラーゼタンパク質をコードするlpxD遺伝子の活性の改変に加えて、本発明の組換え微生物は、(d)リン酸アセチルトランスフェラーゼをコードするpta遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失(ここでpta遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失は、それぞれの参照微生物と比較して決定される)をさらに含んでもよい。

30

【0031】

分枝鎖アミノ酸トランスポーター活性を有するbrnQタンパク質をコードするbrnQ遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失、並びに/あるいはDNA結合/転写活性化活性を有するargPタンパク質をコードするargP遺伝子の活性及び/又は発現の導入、増大又は増強、並びに/あるいはDNA結合タンパク質をコードするgcvA遺伝子の活性及び/又は発現の導入、増大又は増強、並びに/あるいは非タンパク質コードRNAをコードするgcvB遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失、並びに/あるいはUDP-3-O-(3-ヒドロキシミリストール)-グルコサミン N-アシルトランスフェラーゼタンパク質をコードするlpxD遺伝子の活性の改変に加えて、本発明の組換え微生物は、(e)酢酸キナーゼをコードするackA遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失(ここでackA遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失は、それぞれの参照微生物と比較して決定

40

50

される)をさらに含んでもよい。

【0032】

分枝鎖アミノ酸トランスポーター活性を有するbrnQタンパク質をコードするbrnQ遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失、並びに/あるいはDNA結合/転写活性化活性を有するargPタンパク質をコードするargP遺伝子の活性及び/又は発現の導入、増大又は増強、並びに/あるいはDNA結合タンパク質をコードするgcvA遺伝子の活性及び/又は発現の導入、増大又は増強、並びに/あるいは非タンパク質コードRNAをコードするgcvB遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失、並びに/あるいはUDP-3-O-(3-ヒドロキシミリストール)-グルコサミン N-アシルトランスフェラーゼタンパク質をコードするlpxD遺伝子の活性の改変に加えて、本発明の組換え微生物は、(f)フマル酸レダクターゼをコードするfrdA遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失(ここでfrdA遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失は、それぞれの参照微生物と比較して決定される)をさらに含んでもよい。

10

【0033】

分枝鎖アミノ酸トランスポーター活性を有するbrnQタンパク質をコードするbrnQ遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失、並びに/あるいはDNA結合/転写活性化活性を有するargPタンパク質をコードするargP遺伝子の活性及び/又は発現の導入、増大又は増強、並びに/あるいはDNA結合タンパク質をコードするgcvA遺伝子の活性及び/又は発現の導入、増大又は増強、並びに/あるいは非タンパク質コードRNAをコードするgcvB遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失、並びに/あるいはUDP-3-O-(3-ヒドロキシミリストール)-グルコサミン N-アシルトランスフェラーゼタンパク質をコードするlpxD遺伝子の活性の改変に加えて、本発明の組換え微生物は、(g)アラニンデヒドロゲナーゼをコードするalaD遺伝子の活性及び/又は発現の導入、増大又は増強(ここでalaD遺伝子の活性及び/又は発現の増大又は増強は、それぞれの参照微生物と比較して決定される)をさらに含んでもよい。

20

【0034】

分枝鎖アミノ酸トランスポーター活性を有するbrnQタンパク質をコードするbrnQ遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失、並びに/あるいはDNA結合/転写活性化活性を有するargPタンパク質をコードするargP遺伝子の活性及び/又は発現の導入、増大又は増強、並びに/あるいはDNA結合タンパク質をコードするgcvA遺伝子の活性及び/又は発現の導入、増大又は増強、並びに/あるいは非タンパク質コードRNAをコードするgcvB遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失、並びに/あるいはUDP-3-O-(3-ヒドロキシミリストール)-グルコサミン N-アシルトランスフェラーゼタンパク質をコードするlpxD遺伝子の活性の改変に加えて、本発明の組換え微生物は、(h)アラニンラセマーゼをコードするdadZ遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失(ここでdadZ遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失は、それぞれの参照微生物と比較して決定される)をさらに含んでもよい。

30

【0035】

分枝鎖アミノ酸トランスポーター活性を有するbrnQタンパク質をコードするbrnQ遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失、並びに/あるいはDNA結合/転写活性化活性を有するargPタンパク質をコードするargP遺伝子の活性及び/又は発現の導入、増大又は増強、並びに/あるいはDNA結合タンパク質をコードするgcvA遺伝子の活性及び/又は発現の導入、増大又は増強、並びに/あるいは非タンパク質コードRNAをコードするgcvB遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失、並びに/あるいはUDP-3-O-(3-ヒドロキシミリストール)-グルコサミン N-アシルトランスフェラーゼタンパク質をコードするlpxD遺伝子の活性の改変に加えて、本発明の組換え微生物は、(i)アラニントランスポーターをコードするygaW遺伝子の活性及び/又は発現の導入、増大又は増強(ここでygaW遺伝子の活性及び/又は発現の増大又は増強は、WO2012/172822及びPCT/IB2014/064426(後者は参照により組み込まれる)に記載のようにそれぞれの参照微生物と比較して決定される)をさらに含んでもよい。

40

50

【 0 0 3 6 】

分枝鎖アミノ酸トランスポーター活性を有するbrnQタンパク質をコードするbrnQ遺伝子の活性及び／又は発現の低減、抑制又は欠失、並びに／あるいはDNA結合／転写活性化活性を有するargPタンパク質をコードするargP遺伝子の活性及び／又は発現の導入、増大又は増強、並びに／あるいはDNA結合タンパク質をコードするgcvA遺伝子の活性及び／又は発現の導入、増大又は増強、並びに／あるいは非タンパク質コードRNAをコードするgcvB遺伝子の活性及び／又は発現の低減、抑制又は欠失、並びに／あるいはUDP-3-O-(3-ヒドロキシミリストール)-グルコサミン N-アシルトランスフェラーゼタンパク質をコードするlpxD遺伝子の活性の改変に加えて、本発明の組換え微生物は、(j) Zリングアセンブリに關与する細胞分裂タンパク質をコードするzipA遺伝子の活性及び／又は発現の導入、増大又は増強(ここでzipA遺伝子の活性及び／又は発現の増大又は増強は、PCT/IB2014/064426(参照により本明細書に組み込まれる)に記載のようにそれぞれの参照微生物と比較して決定される)をさらに含んでもよい。

10

【 0 0 3 7 】

分枝鎖アミノ酸トランスポーター活性を有するbrnQタンパク質をコードするbrnQ遺伝子の活性及び／又は発現の低減、抑制又は欠失、並びに／あるいはDNA結合／転写活性化活性を有するargPタンパク質をコードするargP遺伝子の活性及び／又は発現の導入、増大又は増強、並びに／あるいはDNA結合タンパク質をコードするgcvA遺伝子の活性及び／又は発現の導入、増大又は増強、並びに／あるいは非タンパク質コードRNAをコードするgcvB遺伝子の活性及び／又は発現の低減、抑制又は欠失、並びに／あるいはUDP-3-O-(3-ヒドロキシミリストール)-グルコサミン N-アシルトランスフェラーゼタンパク質をコードするlpxD遺伝子の活性の改変に加えて、本発明の組換え微生物は、(k) リポアミドデヒドロゲナーゼをコードするlpd遺伝子の活性及び／又は発現の導入、増大又は増強(ここでlpd遺伝子の活性及び／又は発現の増大又は増強は、PCT/IB2014/064426に記載のようにそれぞれの参照微生物と比較して決定される)をさらに含んでもよい。

20

【 0 0 3 8 】

好ましくは、分枝鎖アミノ酸トランスポーター活性を有するbrnQタンパク質をコードするbrnQ遺伝子の活性及び／又は発現の低減、抑制又は欠失、並びに／あるいはDNA結合／転写活性化活性を有するargPタンパク質をコードするargP遺伝子の活性及び／又は発現の導入、増大又は増強、並びに／あるいはDNA結合タンパク質をコードするgcvA遺伝子の活性及び／又は発現の導入、増大又は増強、並びに／あるいは非タンパク質コードRNAをコードするgcvB遺伝子の活性及び／又は発現の低減、抑制又は欠失、並びに／あるいはUDP-3-O-(3-ヒドロキシミリストール)-グルコサミン N-アシルトランスフェラーゼタンパク質をコードするlpxD遺伝子の活性の改変、の少なくとも1つを含む本発明の組換え微生物は、以下：

30

(a) ピルビン酸ギ酸リアーゼIをコードするpflB遺伝子の活性及び／又は発現の低減、抑制又は欠失、並びに

(b) 二官能性アセトアルデヒド-CoAデヒドロゲナーゼ／鉄依存性アルコールデヒドロゲナーゼ／ピルビン酸-ギ酸リアーゼデアクチパーゼをコードするadhE遺伝子の活性及び／又は発現の低減、抑制又は欠失、並びに

40

(c) NAD依存性発酵性D-乳酸デヒドロゲナーゼをコードするldhA遺伝子の活性及び／又は発現の低減、抑制又は欠失、並びに

(d) リン酸アセチルトランスフェラーゼをコードするpta遺伝子の活性及び／又は発現の低減、抑制又は欠失、並びに

(e) 酢酸キナーゼをコードするackA遺伝子の活性及び／又は発現の低減、抑制又は欠失、

(f) フマル酸レダクターゼをコードするfrdA遺伝子の活性及び／又は発現の低減、抑制又は欠失、

(g) アラニンデヒドロゲナーゼをコードするalaD遺伝子の活性及び／又は発現の導入、増大又は増強、

50

(h) アラニンレダクターゼをコードするdadX遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失、

(i) アラニントランスポーターをコードするygaW遺伝子の活性及び/又は発現の導入、増大又は増強、

(j) Zリングアセンブリに關与する細胞分裂タンパク質をコードするzipA遺伝子の活性及び/又は発現の導入、増大又は増強、並びに

(k) リポアミドデヒドロゲナーゼをコードするlpd遺伝子の活性及び/又は発現の導入、増大又は増強

(ここで、遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制、欠失、増大又は増強は、それぞれの参照微生物と比較して決定される)

の群より選択される特徴の少なくとも2つ、好ましくは少なくとも3つ、より好ましくは少なくとも4つ、よりさらに好ましくは少なくとも5つ、よりさらに好ましくは少なくとも6つ、よりさらに好ましくは少なくとも7つ、よりさらに好ましくは少なくとも8つ、最も好ましくは全てをさらに有する。

【0039】

alaD遺伝子は、任意の生物に由来してもよいし、又は人為的に設計された合成遺伝子、例えば本発明の組換え微生物における発現のために最適化されたコドン頻度を有する又は酵素活性が最適化された、例えばVmax若しくはKmが改善された合成遺伝子であってもよい。好ましくは、alaD遺伝子は、バチルス(Bacillus)、ゲオバチルス(Geobacillus)、パエニバチルス(Paenibacillus)、ハロバチルス(Halobacillus)、ブレビバチルス(Brevibacillus)属の1つの微生物に由来する。より好ましい実施形態において、alaD遺伝子はゲオバチルス属の微生物に由来する。最も好ましい実施形態において、alaD遺伝子はゲオバチルス・ステアロサーモフィルス(Geobacillus stearothermophilus)に由来する。

【0040】

好ましい実施形態において、alaD遺伝子は、本発明の組換え微生物における発現のためにコドン最適化されている。

【0041】

本発明の微生物は、アラニン、ピルベート、スクシネート、アスパルテート、マレート、ラクテート、バリン及び/又はロイシン、好ましくはスクシネート又はアラニン、より好ましくはアラニンの収量及び/又は生産性をさらに改善する、遺伝的改変、例えば突然変異、ノックアウト又は酵素活性の増強若しくは導入をさらに含んでもよい。

【0042】

さらなる実施形態において、本発明の組換え微生物において活性及び/又は発現が低減、抑制又は欠失された、分枝鎖アミノ酸トランスポーター活性を有するbrnQタンパク質をコードするbrnQ遺伝子は、以下の核酸分子：

(i) 配列番号1の配列を含む核酸分子、又は

(ii) 配列番号1の核酸分子に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、例えば少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、例えば少なくとも96%、よりさらに好ましくは少なくとも97%、例えば少なくとも98%、最も好ましくは少なくとも99%の同一性を有する核酸分子、又は

(iii) 中程度にストリンジェントな条件下で、より好ましくは高度にストリンジェントな条件下で、最も好ましくは非常に高度にストリンジェントな条件下で配列番号1を有する核酸分子にハイブリダイズする核酸分子、又は

(iv) 配列番号2のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

(v) 配列番号2のポリペプチドに対して少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、例えば少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、例えば少なくとも85%、よりさらに好ましくは少なくとも90%、例えば少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の相同性を有するポリペプチドをコードする核酸分子

10

20

30

40

50

の群から選択され、

(ii)、(iii)又は(v)によりコードされるポリペプチドは、配列番号2を有するポリペプチドの少なくとも10%、20%、好ましくは少なくとも30%又は50%、より好ましくは少なくとも60%又は70%、よりさらに好ましくは少なくとも75%、80%、85%又は90%、最も好ましくは少なくとも95%の活性を有し、

上で定義した変異型遺伝子及び/又はタンパク質を含む微生物は発酵におけるアラニン収量の改善を有する。

【0043】

一例において、本発明の組換え微生物において活性及び/又は発現が低減、抑制又は欠失された、分枝鎖アミノ酸トランスポーター活性を有するbrnQタンパク質をコードするbrnQ遺伝子は、配列番号4を有するタンパク質をコードする配列番号3の配列を有する。

10

【0044】

さらなる実施形態において、本発明の組換え微生物において活性及び/又は発現が導入、増大又は増強された、DNA結合/転写活性化活性を有するargPタンパク質をコードするargP遺伝子は、以下の核酸分子：

(i) 配列番号45の配列を含む核酸分子、又は

(ii) 配列番号45の核酸分子に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、例えば少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、例えば少なくとも96%、よりさらに好ましくは少なくとも97%、例えば少なくとも98%、最も好ましくは少なくとも99%の同一性を有する核酸分子、又は

20

(iii) 中程度にストリンジェントな条件下で、より好ましくは高度にストリンジェントな条件下で、最も好ましくは非常に高度にストリンジェントな条件下で配列番号45を有する核酸分子にハイブリダイズする核酸分子、又は

(iv) 配列番号46のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

(v) 配列番号46のポリペプチドに対して少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、例えば少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、例えば少なくとも85%、よりさらに好ましくは少なくとも90%、例えば少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の相同性を有するポリペプチドをコードする核酸分子

の群から選択され、

30

(ii)、(iii)又は(v)によりコードされるポリペプチドは、配列番号46を有するポリペプチドの少なくとも10%、20%、好ましくは少なくとも30%又は50%、より好ましくは少なくとも60%又は70%、よりさらに好ましくは少なくとも75%、80%、85%又は90%、最も好ましくは少なくとも95%の活性を有し、

上で定義した変異型遺伝子及び/又はタンパク質を含む微生物は発酵におけるアラニン収量の改善を有する。

【0045】

一例において、本発明の組換え微生物において活性及び/又は発現が導入、増大又は増強された、DNA結合/転写活性化活性を有するargPタンパク質をコードするargP遺伝子は、配列番号48を有するタンパク質をコードする配列番号47の配列を有する。

40

【0046】

さらなる実施形態において、本発明の組換え微生物において活性及び/又は発現が導入、増大又は増強された、DNA結合タンパク質をコードするgcvA遺伝子は、以下の核酸分子：

(i) 配列番号53の配列を含む核酸分子、又は

(ii) 配列番号53の核酸分子に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、例えば少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、例えば少なくとも96%、よりさらに好ましくは少なくとも97%、例えば少なくとも98%、最も好ましくは少なくとも99%の同一性を有する核酸分子、又は

(iii) 中程度にストリンジェントな条件下で、より好ましくは高度にストリンジェントな条件下で、最も好ましくは非常に高度にストリンジェントな条件下で配列番号53を有する核

50

酸分子にハイブリダイズする核酸分子、又は

(iv) 配列番号54のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

(v) 配列番号54のポリペプチドに対して少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、例えば少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、例えば少なくとも85%、よりさらに好ましくは少なくとも90%、例えば少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の相同性を有するポリペプチドをコードする核酸分子

の群から選択され、

(ii)、(iii)又は(v)によりコードされるポリペプチドは、配列番号54を有するポリペプチドの少なくとも10%、20%、好ましくは少なくとも30%又は50%、より好ましくは少なくとも60%又は70%、よりさらに好ましくは少なくとも75%、80%、85%又は90%、最も好ましくは少なくとも95%の活性を有し、

上で定義した変異型遺伝子及び/又はタンパク質を含む微生物は発酵におけるアラニン収量の改善を有する。

【0047】

さらなる実施形態において、本発明の組換え微生物において活性及び/又は発現が低減、抑制又は欠失された、非タンパク質コードRNAをコードするgcvB遺伝子は、以下の核酸分子：

(i) 配列番号58の配列を含む核酸分子、又は

(ii) 配列番号58の核酸分子に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、例えば少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、例えば少なくとも96%、よりさらに好ましくは少なくとも97%、例えば少なくとも98%、最も好ましくは少なくとも99%の同一性を有する核酸分子、又は

(iii) 中程度にストリンジェントな条件下で、より好ましくは高度にストリンジェントな条件下で、最も好ましくは非常に高度にストリンジェントな条件下で配列番号58を有する核酸分子にハイブリダイズする核酸分子、又は

の群から選択され、

(ii)、(iii)又は(v)によりコードされる非タンパク質コードRNAは、配列番号58を有する非タンパク質コードRNAの少なくとも10%、20%、好ましくは少なくとも30%又は50%、より好ましくは少なくとも60%又は70%、よりさらに好ましくは少なくとも75%、80%、85%又は90%、最も好ましくは少なくとも95%の活性を有し、

上で定義した変異型遺伝子を含む微生物は発酵におけるアラニン収量の改善を有する。

【0048】

さらなる実施形態において、本発明の組換え微生物において活性及び/又は発現が改変された、UDP-3-O-(3-ヒドロキシミリストール)-グルコサミン N-アシルトランスフェラーゼタンパク質をコードするlpxD遺伝子は、以下の核酸分子：

(i) 配列番号49の配列を含む核酸分子、又は

(ii) 配列番号49の核酸分子に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、例えば少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、例えば少なくとも96%、よりさらに好ましくは少なくとも97%、例えば少なくとも98%、最も好ましくは少なくとも99%の同一性を有する核酸分子、又は

(iii) 中程度にストリンジェントな条件下で、より好ましくは高度にストリンジェントな条件下で、最も好ましくは非常に高度にストリンジェントな条件下で配列番号49を有する核酸分子にハイブリダイズする核酸分子、又は

(iv) 配列番号50のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

(v) 配列番号50のポリペプチドに対して少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、例えば少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、例えば少なくとも85%、よりさらに好ましくは少なくとも90%、例えば少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の相同性を有するポリペプチドをコードする核酸分子

10

20

30

40

50

の群から選択され、

ここで配列番号49の43～45位に対応する(i)～(v)に属する遺伝子のコドンがアミノ酸アラニンをコードせず、かつ終止コドンでないか、又は配列番号50の15位に対応する(i)～(v)に属する遺伝子によりコードされるタンパク質のアミノ酸がアラニンでなく、

(1)～(5)において上で定義した遺伝子によりコードされるタンパク質が、配列番号50を有するタンパク質と比較して活性及び/又は発現が改変されており、

上で定義された変異型の遺伝子及び/又はタンパク質を含む微生物は、発酵においてアラニン収量の改善を有する。

【0049】

一例において、本発明の組換え微生物において活性及び/又は発現が改変された、UDP-3-O-(3-ヒドロキシミリストール)-グルコサミン N-アシルトランスフェラーゼタンパク質をコードするlpxD遺伝子は、配列番号52を有するタンパク質をコードする配列番号51の配列を有する。

【0050】

分枝鎖アミノ酸トランスポータータンパク質をコードするbrnQ遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失、並びに/あるいはDNA結合/転写活性化活性を有するargPタンパク質をコードするargP遺伝子の活性及び/又は発現の導入、増大又は増強、並びに/あるいはDNA結合タンパク質をコードするgcvA遺伝子の活性及び/又は発現の導入、増大又は増強、並びに/あるいは非タンパク質コードRNAをコードするgcvB遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失、並びに/あるいはUDP-3-O-(3-ヒドロキシミリストール)-グルコサミン N-アシルトランスフェラーゼタンパク質をコードするlpxD遺伝子の活性の改変、の少なくとも1つを含む本発明の組換え微生物はさらに(a)～(k)で上で定義した特徴のいずれか1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ又は全てを含んでもよく、

pf1B遺伝子は、以下の核酸分子：

(A) 配列番号5の配列を含む核酸分子、又は

(B) 配列番号5の核酸分子に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、例えば少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、例えば少なくとも96%、よりさらに好ましくは少なくとも97%、例えば少なくとも98%、最も好ましくは少なくとも99%の同一性を有する核酸分子、又は

(C) 中程度にストリンジェントな条件下で、より好ましくは高度にストリンジェントな条件下で、最も好ましくは非常に高度にストリンジェントな条件下で配列番号5を有する核酸分子にハイブリダイズする核酸分子、又は

(D) 配列番号6のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

(E) 配列番号6のポリペプチドに対して少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、例えば少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、例えば少なくとも85%、よりさらに好ましくは少なくとも90%、例えば少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の相同性を有するポリペプチドをコードする核酸分子

からなる群より選択され、

(B)、(C)又は(E)によりコードされるポリペプチドは、配列番号6を有するポリペプチドの少なくとも10%、20%、好ましくは少なくとも30%又は50%、より好ましくは少なくとも60%又は70%、よりさらに好ましくは少なくとも75%、80%、85%又は90%、最も好ましくは少なくとも95%の活性を有し、

adhE遺伝子は、以下の核酸分子：

(F) 配列番号7の配列を含む核酸分子、又は

(G) 配列番号7の核酸分子に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、例えば少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、例えば少なくとも96%、よりさらに好ましくは少なくとも97%、例えば少なくとも98%、最も好ましくは少なくとも99%の同一性を有する核酸分子、又は

10

20

30

40

50

(H) 中程度にストリンジェントな条件下で、より好ましくは高度にストリンジェントな条件下で、最も好ましくは非常に高度にストリンジェントな条件下で配列番号7を有する核酸分子にハイブリダイズする核酸分子、又は

(I) 配列番号8のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

(J) 配列番号8のポリペプチドに対して少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、例えば少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、例えば少なくとも85%、よりさらに好ましくは少なくとも90%、例えば少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の相同性を有するポリペプチドをコードする核酸分子

からなる群より選択され、

10

(G)、(H)又は(J)によりコードされるポリペプチドは、配列番号8を有するポリペプチドの少なくとも10%、20%、好ましくは少なくとも30%又は50%、より好ましくは少なくとも60%又は70%、よりさらに好ましくは少なくとも75%、80%、85%又は90%、最も好ましくは少なくとも95%の活性を有し、

ldhA遺伝子は、以下の核酸分子：

(K) 配列番号9の配列を含む核酸分子、又は

(L) 配列番号9の核酸分子に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、例えば少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、例えば少なくとも96%、よりさらに好ましくは少なくとも97%、例えば少なくとも98%、最も好ましくは少なくとも99%の同一性を有する核酸分子、又は

20

(M) 中程度にストリンジェントな条件下で、より好ましくは高度にストリンジェントな条件下で、最も好ましくは非常に高度にストリンジェントな条件下で配列番号9を有する核酸分子にハイブリダイズする核酸分子、又は

(N) 配列番号10のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

(O) 配列番号10のポリペプチドに対して少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、例えば少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、例えば少なくとも85%、よりさらに好ましくは少なくとも90%、例えば少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の相同性を有するポリペプチドをコードする核酸分子

からなる群より選択され、

30

(L)、(M)又は(O)によりコードされるポリペプチドは、配列番号10を有するポリペプチドの少なくとも10%、20%、好ましくは少なくとも30%又は50%、より好ましくは少なくとも60%又は70%、よりさらに好ましくは少なくとも75%、80%、85%又は90%、最も好ましくは少なくとも95%の活性を有し、

pta遺伝子は、以下の核酸分子：

(P) 配列番号11の配列を含む核酸分子、又は

(Q) 配列番号11の核酸分子に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、例えば少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、例えば少なくとも96%、よりさらに好ましくは少なくとも97%、例えば少なくとも98%、最も好ましくは少なくとも99%の同一性を有する核酸分子、又は

40

(R) 中程度にストリンジェントな条件下で、より好ましくは高度にストリンジェントな条件下で、最も好ましくは非常に高度にストリンジェントな条件下で配列番号11を有する核酸分子にハイブリダイズする核酸分子、又は

(S) 配列番号12のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

(T) 配列番号12のポリペプチドに対して少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、例えば少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、例えば少なくとも85%、よりさらに好ましくは少なくとも90%、例えば少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の相同性を有するポリペプチドをコードする核酸分子

からなる群より選択され、

50

(Q)、(R)又は(T)によりコードされるポリペプチドは、配列番号12を有するポリペプチドの少なくとも10%、20%、好ましくは少なくとも30%又は50%、より好ましくは少なくとも60%又は70%、よりさらに好ましくは少なくとも75%、80%、85%又は90%、最も好ましくは少なくとも95%の活性を有し、

ackA遺伝子は、以下の核酸分子：

(U) 配列番号120の配列を含む核酸分子、又は

(V) 配列番号120の核酸分子に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、例えば少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、例えば少なくとも96%、よりさらに好ましくは少なくとも97%、例えば少なくとも98%、最も好ましくは少なくとも99%の同一性を有する核酸分子、又は

(W) 中程度にストリンジェントな条件下で、より好ましくは高度にストリンジェントな条件下で、最も好ましくは非常に高度にストリンジェントな条件下で配列番号120を有する核酸分子にハイブリダイズする核酸分子、又は

(X) 配列番号121のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

(Y) 配列番号121のポリペプチドに対して少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、例えば少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、例えば少なくとも85%、よりさらに好ましくは少なくとも90%、例えば少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の相同性を有するポリペプチドをコードする核酸分子

からなる群より選択され、

(V)、(W)又は(Y)によりコードされるポリペプチドは、配列番号121を有するポリペプチドの少なくとも10%、20%、好ましくは少なくとも30%又は50%、より好ましくは少なくとも60%又は70%、よりさらに好ましくは少なくとも75%、80%、85%又は90%、最も好ましくは少なくとも95%の活性を有し、

frdA遺伝子は、以下の核酸分子：

(Z) 配列番号13の配列を含む核酸分子、又は

(AA) 配列番号13の核酸分子に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、例えば少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、例えば少なくとも96%、よりさらに好ましくは少なくとも97%、例えば少なくとも98%、最も好ましくは少なくとも99%の同一性を有する核酸分子、又は

(BB) 中程度にストリンジェントな条件下で、より好ましくは高度にストリンジェントな条件下で、最も好ましくは非常に高度にストリンジェントな条件下で配列番号13を有する核酸分子にハイブリダイズする核酸分子、又は

(CC) 配列番号14のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

(DD) 配列番号14のポリペプチドに対して少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、例えば少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、例えば少なくとも85%、よりさらに好ましくは少なくとも90%、例えば少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の相同性を有するポリペプチドをコードする核酸分子

からなる群より選択され、

(AA)、(BB)又は(DD)によりコードされるポリペプチドは、配列番号14を有するポリペプチドの少なくとも10%、20%、好ましくは少なくとも30%又は50%、より好ましくは少なくとも60%又は70%、よりさらに好ましくは少なくとも75%、80%、85%又は90%、最も好ましくは少なくとも95%の活性を有し、

alaD遺伝子は、以下の核酸分子：

(EE) 配列番号15の配列を含む核酸分子、又は

(FF) 配列番号15の核酸分子に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、例えば少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、例えば少なくとも96%、よりさらに好ましくは少なくとも97%、例えば少なくとも98%、最も好ましくは少なくとも99%の同一性を有する核酸分子、又は

10

20

30

40

50

(GG) 中程度にストリンジェントな条件下で、より好ましくは高度にストリンジェントな条件下で、最も好ましくは非常に高度にストリンジェントな条件下で配列番号15を有する核酸分子にハイブリダイズする核酸分子、又は

(HH) 配列番号16のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

(II) 配列番号16のポリペプチドに対して少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、例えば少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、例えば少なくとも85%、よりさらに好ましくは少なくとも90%、例えば少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の相同性を有するポリペプチドをコードする核酸分子

からなる群より選択され、

(FF)、(GG)又は(II)によりコードされるポリペプチドは、配列番号16を有するポリペプチドの少なくとも10%、20%、好ましくは少なくとも30%又は50%、より好ましくは少なくとも60%又は70%、よりさらに好ましくは少なくとも75%、80%、85%又は90%、最も好ましくは少なくとも95%の活性を有し、

dadX遺伝子は、以下の核酸分子：

(JJ) 配列番号118の配列を含む核酸分子、又は

(KK) 配列番号118の核酸分子に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、例えば少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、例えば少なくとも96%、よりさらに好ましくは少なくとも97%、例えば少なくとも98%、最も好ましくは少なくとも99%の同一性を有する核酸分子、又は

(LL) 中程度にストリンジェントな条件下で、より好ましくは高度にストリンジェントな条件下で、最も好ましくは非常に高度にストリンジェントな条件下で配列番号118を有する核酸分子にハイブリダイズする核酸分子、又は

(MM) 配列番号119のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

(NN) 配列番号119のポリペプチドに対して少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、例えば少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、例えば少なくとも85%、よりさらに好ましくは少なくとも90%、例えば少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の相同性を有するポリペプチドをコードする核酸分子

からなる群より選択され、

(KK)、(LL)又は(NN)によりコードされるポリペプチドは、配列番号119を有するポリペプチドの少なくとも10%、20%、好ましくは少なくとも30%又は50%、より好ましくは少なくとも60%又は70%、よりさらに好ましくは少なくとも75%、80%、85%又は90%、最も好ましくは少なくとも95%の活性を有し、

ygaW遺伝子は、以下の核酸分子：

(OO) 配列番号109の配列を含む核酸分子、又は

(PP) 配列番号109の核酸分子に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、例えば少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、例えば少なくとも96%、よりさらに好ましくは少なくとも97%、例えば少なくとも98%、最も好ましくは少なくとも99%の同一性を有する核酸分子、又は

(QQ) 中程度にストリンジェントな条件下で、より好ましくは高度にストリンジェントな条件下で、最も好ましくは非常に高度にストリンジェントな条件下で配列番号109を有する核酸分子にハイブリダイズする核酸分子、又は

(RR) 配列番号110のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

(SS) 配列番号110のポリペプチドに対して少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、例えば少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、例えば少なくとも85%、よりさらに好ましくは少なくとも90%、例えば少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の相同性を有するポリペプチドをコードする核酸分子

からなる群より選択され、

10

20

30

40

50

(PP)、(QQ)又は(SS)によりコードされるポリペプチドは、配列番号110を有するポリペプチドの少なくとも10%、20%、好ましくは少なくとも30%又は50%、より好ましくは少なくとも60%又は70%、よりさらに好ましくは少なくとも75%、80%、85%又は90%、最も好ましくは少なくとも95%の活性を有し、

zipA遺伝子は、以下の核酸分子：

(TT) 配列番号111の配列を含む核酸分子、又は

(UU) 配列番号111の核酸分子に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、例えば少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、例えば少なくとも96%、よりさらに好ましくは少なくとも97%、例えば少なくとも98%、最も好ましくは少なくとも99%の同一性を有する核酸分子、又は

10

(VV) 中程度にストリンジェントな条件下で、より好ましくは高度にストリンジェントな条件下で、最も好ましくは非常に高度にストリンジェントな条件下で配列番号111を有する核酸分子にハイブリダイズする核酸分子、又は

(WW) 配列番号112のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

(XX) 配列番号112のポリペプチドに対して少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、例えば少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、例えば少なくとも85%、よりさらに好ましくは少なくとも90%、例えば少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の相同性を有するポリペプチドをコードする核酸分子

からなる群より選択され、

20

(UU)、(VV)又は(XX)によりコードされるポリペプチドは、配列番号112を有するポリペプチドの少なくとも10%、20%、好ましくは少なくとも30%又は50%、より好ましくは少なくとも60%又は70%、よりさらに好ましくは少なくとも75%、80%、85%又は90%、最も好ましくは少なくとも95%の活性を有し、

lpd遺伝子は、以下の核酸分子：

(YY) 配列番号113の配列を含む核酸分子、又は

(ZZ) 配列番号113の核酸分子に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、例えば少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、例えば少なくとも96%、よりさらに好ましくは少なくとも97%、例えば少なくとも98%、最も好ましくは少なくとも99%の同一性を有する核酸分子、又は

30

(AAA) 中程度にストリンジェントな条件下で、より好ましくは高度にストリンジェントな条件下で、最も好ましくは非常に高度にストリンジェントな条件下で配列番号113を有する核酸分子にハイブリダイズする核酸分子、又は

(BBB) 配列番号114のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

(CCC) 配列番号114のポリペプチドに対して少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、例えば少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、例えば少なくとも85%、よりさらに好ましくは少なくとも90%、例えば少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の相同性を有するポリペプチドをコードする核酸分子

からなる群より選択され、

40

(ZZ)、(AAA)又は(CCC)によりコードされるポリペプチドは、配列番号114を有するポリペプチドの少なくとも10%、20%、好ましくは少なくとも30%又は50%、より好ましくは少なくとも60%又は70%、よりさらに好ましくは少なくとも75%、80%、85%又は90%、最も好ましくは少なくとも95%の活性を有する。

【0051】

好ましくは、(EE)~(II)に定義される核酸分子は、以下：

(1) 配列番号115若しくは116の配列を含む核酸分子、又は

(2) 配列番号115若しくは116の核酸分子に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、例えば少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、例えば少なくとも96%、よりさらに好ましくは少なくとも97%、例えば少なくとも98%、最も好ましくは少

50

なくとも99%の同一性を有する核酸分子、又は

(3) 中程度にストリンジェントな条件下で、より好ましくは高度にストリンジェントな条件下で、最も好ましくは非常に高度にストリンジェントな条件下で配列番号115若しくは116を有する核酸分子にハイブリダイズする核酸分子、又は

(4) 配列番号115若しくは116を有する核酸分子の少なくとも10個のヌクレオチド、好ましくは少なくとも20個のヌクレオチド、少なくとも30個のヌクレオチド若しくは少なくとも40個のヌクレオチドの断片、より好ましくは少なくとも50個のヌクレオチド、少なくとも75個のヌクレオチド若しくは少なくとも100個のヌクレオチド、よりさらに好ましくは少なくとも150個のヌクレオチド若しくは少なくとも200個のヌクレオチドの断片の配列を有する微生物中でプロモーターとして機能する配列の制御下にある。好ましくは、配列番号115若しくは116の断片は、配列番号115若しくは116の3'領域を含む断片であり、したがって配列番号115若しくは116の5'末端に欠失を含む。

10

【0052】

本発明のさらなる実施形態は、上で定義した1又はそれ以上の本発明の組換え微生物を含む組成物である。この組成物は、本発明の組換え微生物の増殖を可能にする培地をさらに含んでもよい。培地はさらに、炭素源、例えばヘキソース、ペントース又はポリオール、例えば、スクロース、グルコース、フルクトース、ガラクトース、マンノース、ラフィノース、キシロース、アラビノース、キシルロース(xylulose)、グリセロール、マンニトール、アラビトール、キシリトール、デンプン、セルロース、リグノセルロース又はそれらの組み合わせを含んでもよい。好ましくは炭素源はグルコース又はスクロースであり、より好ましくは炭素源はグルコースである。

20

【0053】

好ましい実施形態において、本組成物は、本発明の微生物と、NBS培地、AM1培地又はPPM01培地とを含む。より好ましくは、本組成物はさらに、炭素源、好ましくは糖を含む。これらの培地の成分は当業者に公知である。

【0054】

好ましくは、NBS培地は、1リットル当たり、
1~5g、好ましくは3.5gの KH_2PO_4 、及び
1~10g、好ましくは5.0gの K_2HPO_4 、及び
1~5g、好ましくは3.5gの $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、及び
0.1~1g、好ましくは0.25gの $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、及び
5~25mg、好ましくは15mgの $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、及び
0.1~1mg、好ましくは0.5mgのチアミン、及び
0.1~5ml、好ましくは1mlの微量金属ストック
を含み、ここで微量金属ストックは、0.01~1M、好ましくは0.1M HCLの1リットル当たり、0.5~5g、好ましくは1.6gの $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ；0.05~0.5g、好ましくは0.2gの $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ；0.01~0.5g、好ましくは0.1gの $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ；0.1~0.5g、好ましくは0.2gの ZnCl_2 ；0.05~0.5g、好ましくは0.2gの $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ；0.001~0.1g、好ましくは0.05gの H_3BO_3 を含む。

30

【0055】

NBS培地中の好ましい炭素源はグルコース又はスクロース、好ましくは2%~18%グルコース又は2%~16%スクロースである。

40

【0056】

好ましくは、AM 1培地は、0.1~10mM、好ましくは1mMベタイン溶液の1リットル当たり、
1~10g、好ましくは2.6gの $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、及び
0.1~5g、好ましくは0.87gの $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、及び
0.05~2.5g、好ましくは0.15gのKCl、及び
0.05~5g、好ましくは0.37gの $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、及び
0.1~5ml、好ましくは1mlの微量金属ストック

50

を含み、ここで微量金属ストックは、0.01～1M、好ましくは0.12M HCLの1リットル当たり、1～5g、好ましくは2.4gの $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ；0.1～1g、好ましくは0.3gの $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ；0.1～1g、好ましくは0.21gの $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ；0.1～1g、好ましくは0.3gの ZnCl_2 ；0.1～1g、好ましくは0.27gの $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ；0.01～0.5g、好ましくは0.068gの H_3BO_3 及び0.1～1g、好ましくは0.5gの $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ を含み、場合により1～30g、好ましくは15gの $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を含んでもよい。

【0057】

NBS培地中の好ましい炭素源はグルコース又はスクロース、好ましくは2%～18%グルコース又は2%～16%スクロースである。

【0058】

好ましくは、PPM01培地は、1リットル当たり、

0.05～5g、好ましくは0.37gの $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、及び

0.1～10g、好ましくは1gの $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、及び

0.05～5g、好ましくは0.46gのベタイン、及び

0.001～0.5g、好ましくは0.05gのシアノコバラミン(B12)、及び

1～10g、好ましくは3.74gの KH_2PO_4 、及び

0.1～5ml、好ましくは1mlの微量金属ストック

を含み、ここで微量金属ストックは、10～100mM、好ましくは60mM硫酸の1リットル当たり、1～10g、好ましくは3.48gの $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{II})(\text{SO}_4)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；0.1～1g、好ましくは0.35gの $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；0.1～1g、好ましくは0.31gの $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ；0.1～5g、好ましくは0.63gの $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；0.1～1g、好ましくは0.27gの $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；0.01～1g、好ましくは0.07gの $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 及び0.1～5g、好ましくは0.43gの H_3BO_3 を含む。

【0059】

PPM01培地中の好ましい炭素源はグルコース一水和物、好ましくは培地1リットル当たり10～500g、より好ましくは140gのグルコース一水和物である。

【0060】

本発明のさらなる実施形態は、アラニン、ピルベート、スクシネート、アスパルテート、マレート、ラクテート、パリン及び/又はロイシン、好ましくはスクシネート又はアラニン、より好ましくはアラニンの収量又は生産性が增强された組換え微生物の作製方法であって、以下のステップ：

(I) i) 微生物において、brnQ遺伝子又は上の(i)～(v)で定義されているようなものの1以上の活性及び/又は発現を低減、抑制又は欠失する、並びに/あるいは ii) 上の(i)～(v)で定義されているようなargP遺伝子の1以上の活性及び/又は発現を導入、増大又は增强する、並びに/あるいは iii) 上の(i)～(v)で定義されているようなgcvA遺伝子の1以上の活性及び/又は発現を導入、増大又は增强する、並びに/あるいは iv) 上の(i)～(v)で定義されているようなgcvB遺伝子の1以上の活性及び/又は発現を低減、抑制又は欠失する、並びに/あるいは v) 上の(i)～(v)に定義されているようなlpxD遺伝子の活性を改変するステップと、

(II) 上の(I)で定義された改変を有しない対応する微生物と比較して、アラニン、ピルベート、スクシネート、アスパルテート、マレート、ラクテート、パリン及び/又はロイシン、好ましくはスクシネート又はアラニン、より好ましくはアラニンの収量又は生産性が增强された組換え微生物を作出、同定及び単離するステップとを含む方法である。

【0061】

好ましい実施形態において、活性及び/又は発現が低減、抑制又は欠失されたbrnQ遺伝子は、配列番号3の配列を有する及び/又は配列番号4のポリペプチドをコードする。

【0062】

好ましい実施形態において、活性及び/又は発現が導入、増大又は增强されたargP遺伝子は、配列番号47の配列を有する及び/又は配列番号48のポリペプチドをコードする。

【 0 0 6 3 】

好ましい実施形態において、活性及び／又は発現が導入、増大又は増強されたgcvA遺伝子は、配列番号56又は57の配列を有するプロモーターと機能的に連結している。

【 0 0 6 4 】

好ましい実施形態において、活性及び／又は発現が低減、抑制又は欠失されたgcvB遺伝子は、配列番号60又は61の配列を有するプロモーターと機能的に連結している。

【 0 0 6 5 】

好ましい実施形態において、活性及び／又は発現が改変されたlpxD遺伝子は、配列番号51の配列を有する及び／又は配列番号52のポリペプチドをコードする。

【 0 0 6 6 】

本発明の組換え微生物の作製方法の好ましい実施形態において、該方法はさらに、pflB遺伝子、adhE遺伝子、ldhA遺伝子、pta遺伝子、ackA遺伝子、frdA遺伝子又はdadX遺伝子、例えば上の(A)～(DD)及び(JJ)～(NN)で定義する遺伝子、の少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも6つ又は全ての活性及び／又は発現を低減、抑制又は欠失するステップ、並びに／あるいはalaD遺伝子、ygaW遺伝子、zipA遺伝子又はlpd遺伝子、例えば上の(EE)～(II)及び(OO)～(CCC)で定義する遺伝子、の少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ又は全ての活性及び／又は発現を導入、増大又は増強するステップを含む。

【 0 0 6 7 】

本発明の組換え微生物の作製方法のさらに好ましい実施形態において、(EE)～(II)に定義される核酸分子は、

- (1) 配列番号115若しくは116の配列を含む核酸分子、又は
- (2) 配列番号115若しくは116の核酸分子に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、例えば少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、例えば少なくとも96%、よりさらに好ましくは少なくとも97%、例えば少なくとも98%、最も好ましくは少なくとも99%の同一性を有する核酸分子、又は
- (3) 中程度にストリンジェントな条件下で、より好ましくは高度にストリンジェントな条件下で、最も好ましくは非常に高度にストリンジェントな条件下で配列番号115若しくは116を有する核酸分子にハイブリダイズする核酸分子、又は
- (4) 配列番号115若しくは116を有する核酸分子の少なくとも10個のヌクレオチド、好ましくは少なくとも20個のヌクレオチド、少なくとも30個のヌクレオチド若しくは少なくとも40個のヌクレオチドの断片、より好ましくは少なくとも50個のヌクレオチド、少なくとも75個のヌクレオチド若しくは少なくとも100個のヌクレオチド、よりさらに好ましくは少なくとも150個のヌクレオチド若しくは少なくとも200個のヌクレオチドの断片の配列を有する微生物中でプロモーターとして機能する配列の制御下にある。好ましくは、配列番号115若しくは116の断片は、配列番号115若しくは116の3'領域を含む断片、したがって配列番号115若しくは116の5'末端に欠失を含む断片である。

【 0 0 6 8 】

本発明の組換え微生物を作製する最も好ましい方法は、brnQ遺伝子、gcvB遺伝子、pflB遺伝子、adhE遺伝子、ldhA遺伝子、pta遺伝子、ackA遺伝子、frdA遺伝子及びdadX遺伝子のすべての活性及び／又は発現を低減、抑制又は欠失するステップ、並びにalaD遺伝子、ygaW遺伝子、zipA遺伝子、lpd遺伝子、argP遺伝子及びgcvA遺伝子のすべての活性及び／又は発現を導入、増大又は増強するステップ、並びにlpxD遺伝子の活性及び／又は発現を改変するステップ、を含む。

【 0 0 6 9 】

本発明の組換え微生物の作製方法の一実施形態において、微生物は、グルコノバクター・オキシダンス (*Gluconobacter oxydans*)、グルコノバクター・アサイイ (*Gluconobacter asaii*)、アクロモバクター・デルマルヴァエ (*Achromobacter delmarvae*)、アクロモバクター・ヴィスコサス (*Achromobacter viscosus*)、アクロモバクター・ラクチカム (*Achromobacter lacticum*)、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*)、

10

20

30

40

50

acterium tumefaciens)、アグロバクテリウム・ラディオバクター (*Agrobacterium radiobacter*)、アルカリゲネス・フェカリス (*Alcaligenes faecalis*)、アルスロバクター・シトレウス (*Arthrobacter citreus*)、アルスロバクター・ツメセンス (*Arthrobacter tumescens*)、アルスロバクター・パラフィネウス (*Arthrobacter paraffineus*)、アルスロバクター・ヒドロカルボグルタミカス (*Arthrobacter hydrocarboglutamicus*)、アルスロバクター・オキシダンス (*Arthrobacter oxydans*)、アウレオバクテリウム・サペルダエ (*Aureobacterium saperdae*)、アゾトバクター・インディカス (*Azotobacter indicus*)、ブレビバクテリウム・アンモニアゲネス (*Brevibacterium ammoniagenes*)、ブレビバクテリウム・ディバリカタム (*Brevibacterium divaricatum*)、ブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム (*Brevibacterium lactofermentum*)、ブレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*)、ブレビバクテリウム・グロボサム (*Brevibacterium globosum*)、ブレビバクテリウム・フスカム (*Brevibacterium fuscum*)、ブレビバクテリウム・ケトグルタミカム (*Brevibacterium ketoglutamicum*)、ブレビバクテリウム・ヘルコラム (*Brevibacterium helcolum*)、ブレビバクテリウム・プシラム (*Brevibacterium pusillum*)、ブレビバクテリウム・テストセウム (*Brevibacterium testaceum*)、ブレビバクテリウム・ロセウム (*Brevibacterium roseum*)、ブレビバクテリウム・イマリオフィラム (*Brevibacterium immariophilium*)、ブレビバクテリウム・リネンス (*Brevibacterium linens*)、ブレビバクテリウム・プロトファルミエ (*Brevibacterium protopharmiae*)、コリネバクテリウム・アセトフィラム (*Corynebacterium acetophilum*)、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*)、コリネバクテリウム・カルナエ (*Corynebacterium callunae*)、コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム (*Corynebacterium acetoacidophilum*)、コリネバクテリウム・アセトグルタミカム (*Corynebacterium acetoglutamicum*)、エンテロバクター・アエロゲネス (*Enterobacter aerogenes*)、エルウィニア・アミロボーラ (*Erwinia amylovora*)、エルウィニア・カロトボーラ (*Erwinia carotovora*)、エルウィニア・ヘルピコーラ (*Erwinia herbicola*)、エルウィニア・クリサンテミ (*Erwinia chrysanthemi*)、フラボバクテリウム・ペレグリナム (*Flavobacterium peregrinum*)、フラボバクテリウム・フカツム (*Flavobacterium fucatum*)、フラボバクテリウム・アウランティナム (*Flavobacterium aurantium*)、フラボバクテリウム・レナナム (*Flavobacterium rhenanum*)、フラボバクテリウム・セワネンセ (*Flavobacterium sewanense*)、フラボバクテリウム・ブレーベ (*Flavobacterium breve*)、フラボバクテリウム・メニンゴセプティカム (*Flavobacterium meningosepticum*)、マイクロコッカス・エスピー (*Micrococcus sp.*) CCM825、モルガネラ・モルガニイ (*Morganella morganii*)、ノカルジア・オパカ (*Nocardia opaca*)、ノカルジア・ルゴサ (*Nocardia rugosa*)、プラノコッカス・ユーシナタス (*Planococcus eucinatus*)、プロテウス・レッゲリ (*Proteus rettgeri*)、プロピオニバクテリウム・シャーマニイ (*Propionibacterium shermanii*)、シュードモナス・シンキサント (*Pseudomonas synxantha*)、シュードモナス・アゾトフォルマン (*Pseudomonas azotoformans*)、シュードモナス・フルオレッセンス (*Pseudomonas fluorescens*)、シュードモナス・オバリ (*Pseudomonas ovalis*)、シュードモナス・スタツツェリ (*Pseudomonas stutzeri*)、シュードモナス・アシドボランス (*Pseudomonas acidovorans*)、シュードモナス・ムシドレン (*Pseudomonas mucidolens*)、シュードモナス・テストステロニ (*Pseudomonas testosteroni*)、シュードモナス・アエルギノサ (*Pseudomonas aeruginosa*)、ロドコッカス・エリスロポリ (*Rhodococcus erythropolis*)、ロドコッカス・ロドクラウス (*Rhodococcus rhodochrous*)、ロドコッカス・エスピー (*Rhodococcus sp.*) ATCC 15592、ロドコッカス・エスピー (*Rhodococcus sp.*) ATCC 19070、スポロサルシナ・ウレエ (*Sporosarcina ureae*)、スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*)、ビブリオ・メチニコフイ (*Vibrio metschnikovii*)、ビブリオ・チロゲネス (*Vibrio tyrogenes*)、アクチノマデュラ・マデュレ (*Actinomadura madurae*)、アクチノマイセス・ピオラセオクロ

モゲネス (*Actinomyces violaceochromogenes*)、キタサトスポリア・パルロサ (*Kitasatosporia parulosa*)、ストレプトマイセス・アベルミティリス (*Streptomyces avermitilis*)、ストレプトマイセス・コエリコロル (*Streptomyces coelicolor*)、ストレプトマイセス・フラベラス (*Streptomyces flavelus*)、ストレプトマイセス・グリセオラス (*Streptomyces griseolus*)、ストレプトマイセス・リビダンス (*Streptomyces lividans*)、ストレプトマイセス・オリバセウス (*Streptomyces olivaceus*)、ストレプトマイセス・タナシエンシス (*Streptomyces tanashiensis*)、ストレプトマイセス・バージニエ (*Streptomyces virginiae*)、ストレプトマイセス・アンチバイオチクス (*Streptomyces antibioticus*)、ストレプトマイセス・カカオイ (*Streptomyces cacaoi*)、ストレプトマイセス・ラベンデュレ (*Streptomyces lavendulae*)、ストレプトマイセス・ビロドクロモゲネス (*Streptomyces viridochromogenes*)、アエロモナス・サルモニシダ (*Aeromonas salmonicida*)、バチルス・プミルス (*Bacillus pumilus*)、バチルス・サーキュランス (*Bacillus circulans*)、バチルス・チアミノリティカス (*Bacillus thiaminolyticus*)、エシェリキア・フロインディイ (*Escherichia freundii*)、ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム (*Microbacterium ammoniaphilum*)、セラチア・マルセッセンス (*Serratia marcescens*)、サルモネラ・チフィムリウム (*Salmonella typhimurium*)、サルモネラ・ショットムレリ (*Salmonella schottmulleri*)、ザントモナス・シトリ (*Xanthomonas citri*)、シネコシステイス・エスピー (*Synechocystis* sp.)、シネココッカス・エロンガタス (*Synechococcus elongatus*)、サーモシネココッカス・エロンガタス (*Thermosynechococcus elongatus*)、ミクロシステイス・アエルギノサ (*Microcystis aeruginosa*)、ノストック・エスピー (*Nostoc* sp.)、N. コミュネ (*N. commune*)、N. スファエリカム (*N. sphaericum*)、ノストック・プンクチフォルメ (*Nostoc punctiforme*)、スピルリナ・プラテンシス (*Spirulina platensis*)、リングピヤ・マジユスキュラ (*Lyngbya majuscula*)、L. ラゲルハイミイ (*L. lagerheimii*)、フォルミディウム・テヌエ (*Phormidium tenue*)、アナバエナ・エスピー (*Anabaena* sp.)、レプトリングピヤ・エスピー (*Leptolyngbya* sp) などを含む原核生物の群より選択される。

【 0 0 7 0 】

いくつかの実施形態において、微生物は真核細胞である。好適な真核細胞としては、酵母細胞、例えば、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 種、例えばサッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、ハンセヌラ (*Hansenula*) 種、例えばハンセヌラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*)、シゾサッカロミセス (*Schizosaccharomyces*) 種、例えばシゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、クルイベロミセス (*Kluyveromyces*) 種、例えばクルイベロミセス・ラクチス (*Kluyveromyces lactis*) 及びクルイベロミセス・マルキシアナス (*Kluyveromyces marxianus*)、ヤロウィア (*Yarrowia*) 種、例えばヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*)、ピヒア (*Pichia*) 種、例えばピヒア・メタノリカ (*Pichia methanolica*)、ピヒア・スティピテス (*Pichia stipites*) 及びピヒア・パストリス (*Pichia pastoris*)、ジゴサッカロミセス (*Zygosaccharomyces*) 種、例えばジゴサッカロミセス・ルキシー (*Zygosaccharomyces rouxii*) 及びジゴサッカロミセス・バイリイ (*Zygosaccharomyces bailii*)、カンジダ (*Candida*) 種、例えばカンジダ・ボイジニイ (*Candida boidinii*)、カンジダ・ユティリス (*Candida utilis*)、カンジダ・フレイシュシイ (*Candida freyschussii*)、カンジダ・グラブラータ (*Candida glabrata*) 及びカンジダ・ソノレンシス (*Candida sonorensis*)、シュワンニオミセス (*Schwanniomyces*) 種、例えばシュワンニオミセス・オクシデンタリス (*Schwanniomyces occidentalis*)、アルクスラ (*Arxula*) 種、例えばアルクスラ・アデニニボランス (*Arxula adenivorans*)、オガタエア (*Ogataea*) 種、例えばオガタエア・ミヌータ (*Ogataea minuta*)、クレブシエラ (*Klebsiella*) 種、例えばクレブシエラ・ニューモニア (*Klebsiella pneumonia*) が挙げられる。

【 0 0 7 1 】

多数の工業用細菌株が本明細書に開示する方法での使用に特に好適である。いくつかの実施形態において、微生物は、コリネバクテリウム属 (*Corynebacterium*) の種、例えば *C. アセトフィラム* (*C. acetophilum*)、*C. グルタミカム* (*C. glutamicum*)、*C. カルナエ* (*C. callunae*)、*C. アセトアシドフィラム* (*C. acetoacidophilum*)、*C. アセトグルタミカム* (*C. acetoglutamicum*) である。いくつかの実施形態において、微生物は、バチルス (*Bacillus*) 属の種、例えば *B. チューリングゲンシス* (*B. thuringiensis*)、*B. アントラシス* (*B. anthracis*)、*B. メガテリウム* (*B. megaterium*)、*B. ズブチリス* (*B. subtilis*)、*B. レンティルス* (*B. lentils*)、*B. サーキュランス* (*B. circulans*)、*B. プミルス* (*B. pumilus*)、*B. ラウタス* (*B. lautus*)、*B. コアギュランス* (*B. coagulans*)、*B. ブレビス* (*B. brevis*)、*B. フィルムス* (*B. firmus*)、*B. アルカオフィウス* (*B. alkaophilus*)、*B. リケニフォルミス* (*B. licheniformis*)、*B. クラウシイ* (*B. clausii*)、*B. ステアロサーモフィルス* (*B. stearothermophilus*)、*B. ハロデュランス* (*B. halodurans*)、*B. ズブチリス* (*B. subtilis*)、*B. プミルス* (*B. pumilus*)、及び *B. アミロリケファシエンス* (*B. amyloliquefaciens*) である。いくつかの実施形態において、微生物は、エルウィニア (*Erwinia*) 属の種、例えば *E. ウレドボーラ* (*E. uredovora*)、*E. カロトボーラ* (*E. carotovora*)、*E. アナナス* (*E. ananas*)、*E. ヘルビコーラ* (*E. herbicola*)、*E. プンクタータ* (*E. punctata*) 及び *E. テレウス* (*E. terreus*) である。いくつかの実施形態において、微生物は、エシェリキア (*Escherichia*) 属の種、例えば大腸菌 (*E. coli*) である。他の実施形態において、微生物は、パントエア (*Pantoea*) 属の種、例えば *P. シトリア* (*P. citrea*)、*P. アグロメランス* (*P. agglomerans*) である。また他の実施形態において、微生物は、ストレプトミセス (*Streptomyces*) 属の種、例えば *S. アムボファシエンス* (*S. ambofaciens*)、*S. アクロモゲネス* (*S. achromogenes*)、*S. アヴェルミティリス* (*S. avermitilis*)、*S. コエリコロル* (*S. coelicolor*)、*S. アウレオファシエンス* (*S. aureofaciens*)、*S. アウレウス* (*S. aureus*)、*S. フンギシディカス* (*S. fungicidicus*)、*S. グリセウス* (*S. griseus*)、*S. リビダンス* (*S. lividans*) である。さらなる実施形態において、微生物は、ザイモモナス (*Zymomonas*) 属の種、例えば *Z. モビリス* (*Z. mobilis*) 又は *Z. リポリティカ* (*Z. lipolytica*) である。さらなる実施形態において、微生物は、ロドコッカス (*Rhodococcus*) 属の種、例えば *R. オパカス* (*R. opacus*) である。

【0072】

好ましくは、微生物は、腸内細菌科 (*Enterobacteriaceae*) から選択され、好ましくはエシェリキア (*Escherichia*) 属、例えば大腸菌 (*E. coli*)、好ましくは DSMZ 1116 に相当する大腸菌 W 株 (ATCC9637 に相当する) である。

【0073】

本発明のさらなる実施形態は、アラニン、ピルベート、スクシネート、アスパルテート、マレート、ラクテート、パリン及びノ又はロイシン、好ましくはスクシネート又はアラニン、より好ましくはアラニン、最も好ましくは L-アラニンの製造方法であって、上で定義した 1 以上の組換え微生物を、アラニン、ピルベート、スクシネート、アスパルテート、マレート、ラクテート、パリン及びノ又はロイシン、好ましくはスクシネート又はアラニン、より好ましくはアラニン、最も好ましくは L-アラニンの製造を可能にする条件下で培養するステップを含む方法である。

【0074】

いくつかの実施形態において、本発明に包含される組換え微生物は、バッチ発酵又は連続発酵条件下で増殖させる。古典的なバッチ発酵は閉鎖系であり、培地の組成を発酵の開始時に設定して、発酵中は人為的な変更を行わない。バッチ系の変法がフェドバッチ発酵である。この変法では、発酵が進行するにつれ徐々に基質を添加する。フェドバッチ系は、カタボライトリプレッションが細胞の代謝を阻害する可能性がある場合 (培地に限定量の基質が含まれることが望ましい場合) に有用である。バッチ及びフェドバッチ発酵は一般的であり、当技術分野で周知である。本発明においてまた有用である連続発酵は、既定の発酵培地をバイオリアクタに連続的に添加し、等量の条件培地 (例えば所望の最終産物を

10

20

30

40

50

含む)を処理のために同時に取り出す系である。連続発酵は一般的に、一定の高密度で培養物を維持し、そこで細胞は最終産物の産生が増強される増殖期で主に存在する。連続発酵系は、一定の安定増殖条件を維持するように努める。連続発酵プロセスのための栄養素及び増殖因子を変更する方法、並びに産物形成の速度を最大化する技術は、工業的微生物学の分野で周知である。

【0075】

いくつかの実施形態において、発酵は、約10 ~ 約60、約15 ~ 約50、約20 ~ 約45、約25 ~ 約45、約30 ~ 約45、及び約25 ~ 約40の範囲内の温度で行われる。好ましい実施形態において、温度は約34、35又は36である。最も好ましい実施形態において、温度は約37又は38である。

10

【0076】

他のいくつかの実施形態において、発酵は、約8時間~240時間、約8時間~約168時間、約10時間~約144時間、約15時間~約120時間、又は約20時間~約72時間の範囲内の時間にわたり行われる。好ましくは、発酵は約20時間~約40時間行われる。

【0077】

他のいくつかの実施形態において、発酵は、pH約4~約9の範囲内、約4.5~約8.5の範囲内、約5~約8の範囲内、又は約5.5~約7.5の範囲内で行われる。好ましくは、発酵はpH7で行うことができる。

【0078】

アラニン、ピルベート、スクシネート、アスパルテート、マレート、ラクテート、バリン及び/又はロイシン、好ましくはスクシネート又はアラニン、より好ましくはアラニンの製造方法の一実施形態において、微生物は、1%~30%(w/v)の糖、5%~25%(w/v)の糖、10%~20%(w/v)の糖、11%~18%(w/v)の糖を含む培地中で培養される。好ましくは、微生物は、12%~16%(w/v)の糖を含む培地中で培養される。より好ましくは、微生物は、13%~15%(w/v)の糖を含む培地中で培養され、最も好ましくは、微生物は、14%(w/v)の糖を含む培地中で培養される。

20

【0079】

アラニン、ピルベート、スクシネート、アスパルテート、マレート、ラクテート、バリン及び/又はロイシン、好ましくはスクシネート又はアラニン、より好ましくはアラニンの製造方法の別の実施形態において、アラニン、ピルベート、スクシネート、アスパルテート、マレート、ラクテート、バリン及び/又はロイシンの収量は、少なくとも80%、例えば少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%又は少なくとも85%である。好ましくは、収量は、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%又は少なくとも90%である。より好ましくは、収量は、少なくとも90.5%、少なくとも91%、少なくとも91.5%、少なくとも92%、少なくとも92.5%、少なくとも93%、少なくとも93.5%、少なくとも94%又は少なくとも94.5%である。よりさらに好ましい実施形態において、収量は少なくとも95%又は少なくとも95.5%である。最も好ましい実施形態において、収量は少なくとも96%である。収量%は、培地中1gのグルコースから製造される産物gとして計算される。したがって、培地が100gのグルコースを含有し、発酵によって98gのアラニンが生じた場合、収量は98%となる。

30

40

【0080】

アラニンの製造方法の別の実施形態において、好ましくは、L-アラニンのキラル純度が少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%又は少なくとも94%であるL-アラニンが製造される。好ましい実施形態において、L-アラニンのキラル純度は少なくとも95%又は少なくとも95.5%である。より好ましい実施形態において、L-アラニンのキラル純度は、少なくとも96%又は少なくとも96.5%又は少なくとも97%である。よりさらに好ましい実施形態において、L-アラニンのキラル純度は、少なくとも97.5%、少なくとも98%又は少なくとも98.5%、例えば少なくとも99%である。よりさらに好ましくは、L-アラニンのキラル純度は、少なくとも99.5%又は少なくとも99.6%、例えば少なくとも99.7%、少なくとも99.8%、又は少なくとも99.9%である。最も好まし

50

い実施形態において、キラル純粋なL-アラニンが製造される。

【0081】

本発明の別の実施形態は、上で定義した遺伝的に改変された微生物のいずれかを培養する又は増殖させる方法であって、1以上の遺伝的改変微生物を培養培地に接種するステップ、及び上で定義した条件下で培養培地中で該遺伝的改変微生物を培養する又は増殖させるステップを含む方法である。

【0082】

本発明のさらなる実施形態は、アラニン、ピルベート、スクシネート、アスパルテート、マレート、ラクテート、バリン及び/又はロイシン、好ましくはスクシネート又はアラニン、より好ましくはアラニン、最も好ましくはL-アラニンの発酵生産のための、上で定義した組換え微生物又は上で定義した組成物の使用である。

10

【0083】

本発明に係る組換え微生物は、それぞれの参照微生物、例えば野生型と比較して、brnQ遺伝子によりコードされる酵素及び/又はgcvB遺伝子によりコードされるRNAの発現及び/又は活性が低減され、並びに/あるいはargP遺伝子及び/又はgcvA遺伝子によりコードされる酵素の発現及び/又は活性が増大され、並びに/あるいはlpxD遺伝子によりコードされる酵素の活性が改変されていることを特徴とする。

【0084】

用語「の発現及び/又は活性の低減」はまた、brnQ及び/又はgcvBの検出可能な発現及び/又は活性がない野生型微生物を包含する。

20

【0085】

一実施形態において、遺伝子の発現及び/又は活性の低減は、遺伝子の不活性化、変異又はノックアウトにより達成される。これは、遺伝子のコード領域及び/又はプロモーター領域の一部又は全部の欠失により、遺伝子のコード領域にフレームシフトを生じさせる遺伝子の変異、例えばいくつかのヌクレオチド(例として1若しくは2個のヌクレオチド)の挿入又は欠失により、コード領域中の終止コドンの導入により、遺伝子のプロモーターの不活性化により、例えばプロモーターボックス(リボソーム侵入部位、TATAボックスなど)の欠失又は変異により、行うことができる。低減はまた、遺伝子の転写産物の分解により、例えばリボソーム、dsRNA、アンチセンスRNA又はアンチセンスオリゴヌクレオチドの導入による分解により、達成することができる。遺伝子の活性の低減は、標的酵素に特異的に結合する抗体又はアプタマーを細胞中で発現させることにより達成することができる。遺伝子の発現及び/又は活性を低減するための他の方法は当業者に公知である。

30

【0086】

好ましい実施形態において、brnQ遺伝子の発現及び/又は活性の低減は、この遺伝子への、変異、好ましくは欠失の導入により達成される。さらに好ましい実施形態において、欠失は、配列番号1の位置667と764の間に導入され、それによりbrnQ遺伝子から97ヌクレオチドが欠失する。得られるランケートされた核酸は、配列番号3に示される配列を有し、配列番号4に示されるランケートされたタンパク質をコードする。

【0087】

好ましい一実施形態において、argP遺伝子の発現及び/又は活性の増大は、この遺伝子への、変異、好ましくは点突然変異の導入により達成される。より好ましくは、これは、配列番号45のargP遺伝子の位置286~288のコドン又は機能的相同体遺伝子の対応するコドンを変異することによって達成される。よりさらに好ましくは、このコドンは、アミノ酸グルタミン酸又は別の酸性アミノ酸又はそれらのアミド、又はグルタミン酸に類似のアミノ酸(但しアラニンではない)をコードするように変異される。最も好ましい実施形態において、それぞれのコドンは、アミノ酸グルタミン酸をコードするように変異される。

40

【0088】

好ましくは、argP遺伝子の発現及び/又は活性の増大は、argP遺伝子に変異を導入することにより達成され、ここで変異型argP遺伝子は、配列番号48のタンパク質をコードする配列番号47の配列を有する。

50

【0089】

好ましくは、gcvA遺伝子の発現及び/又は活性の増大は、gcvA遺伝子のプロモーターへの変異の導入により達成され、この変異型プロモーターは好ましくは配列番号56又は配列番号57の配列を有する。

【0090】

好ましい実施形態において、gcvB遺伝子の発現及び/又は活性の低減は、プロモーターへの変異の導入により達成される。例えば、プロモーターは、配列番号59の62～68位における塩基Tのいずれか1以上を欠失することにより、又は配列番号59の60位に点変異を導入してこの位置におけるAをG、C若しくはTのいずれかにすることにより、変異させることができる。好ましくは、変異型プロモーターは配列番号60又は61の配列を有する。

10

【0091】

好ましくは、gcvB遺伝子の発現及び/又は活性の低減は、gcvB遺伝子のプロモーターへの変異の導入により達成される。好ましくは、配列番号59を有する野生型プロモーターが、配列番号60又は61の配列を有するように変異される。

【0092】

好ましくは、lpxD遺伝子の発現及び/又は活性の改変は、lpxD遺伝子に変異を導入することにより達成され、ここで変異型lpxD遺伝子は、配列番号52のタンパク質をコードする配列番号51の配列を有する。

【0093】

本明細書に開示されるRNA又は酵素のそれぞれの発現及び/又は活性の低減、特に、乳酸デヒドロゲナーゼ (ldhA)、ピルビン酸ギ酸リアーゼI (pf1B)、二官能性アセトアルデヒド-CoAデヒドロゲナーゼ/鉄依存性アルコールデヒドロゲナーゼ/ピルビン酸-ギ酸リアーゼデアクチパーゼ (adhE)、リン酸アセチルトランスフェラーゼ (pta)、フマル酸レダクターゼ (frdA)、gcvB及び/又はbrnQによりコードされるRNA又は酵素の発現の低減及び/又は活性の低減は、それぞれの参照微生物、例えば野生型の微生物における前記RNA又は酵素の発現及び/若しくは活性と比較して、少なくとも50%の発現及び/若しくは活性の低減、又は少なくとも90%の発現及び/若しくは活性の低減、又はより好ましくは少なくとも95%の発現及び/若しくは活性の低減、又はより好ましくは少なくとも98%の発現及び/若しくは活性の低減、又はさらにより好ましくは少なくとも99%の発現及び/若しくは活性の低減、又はさらにより好ましくは少なくとも99.9%の発現及び/若しくは活性の低減でもよい。最も好ましい実施形態において、RNA又は酵素の発現及び/又は活性は、本発明の微生物において検出されない。

20

30

【0094】

gcvB遺伝子及び/又はbrnQ遺伝子の発現及び/又は活性の喪失、並びにargP遺伝子及び/又はgvcA遺伝子の発現及び/又は活性の導入又は増大、並びにlpxD遺伝子の活性及び/又は発現の改変は、それぞれの参照微生物と比較して、本発明の組換え微生物におけるアラニン、ピルベート、スクシネート、アスパルテート、マレート、ラクテート、バリン及び/又はロイシン、好ましくはスクシネート又はアラニン、より好ましくはアラニンの収量及び/又は生産性の改善をもたらす。したがって、gcvB遺伝子又はbrnQ遺伝子の発現及び/又は活性の喪失、並びにargP遺伝子又はgvcA遺伝子の発現及び/又は活性の導入又は増大、並びにlpxD遺伝子の活性及び/又は発現の改変は、それぞれの参照微生物と比較して、本発明の組換え微生物のアラニン、ピルベート、スクシネート、アスパルテート、マレート、ラクテート、バリン及び/又はロイシン、好ましくはスクシネート又はアラニン、より好ましくはアラニンの収量又は生産性を測定することによって決定することができる。代謝産物、例えばアラニンの発酵生産方法は、当業者に公知であり、また本明細書に記載する。それぞれの参照微生物による発酵におけるアラニン収量と比較した本発明の微生物の発酵における例えばアラニンの収量の改善は、それぞれの遺伝子の発現及び/又は活性の喪失、低減、導入又は増大、又は改変の尺度である。

40

【0095】

乳酸デヒドロゲナーゼ (ldhA) の発現又は活性を測定する方法は、例えば、Bunchら、「

50

The *ldhA* gene encoding the fermentative lactate de hydrogenase of *Escherichia coli*」、*Microbiology* (1997)、第143巻、187～155頁;又はBergmeyer, H.U., Bergmeyer J. and Grassl, M. (1983～1986)、「*Methods of Enzymatic Analysis*」、第3版、第III巻、126～133頁、Verlag Chemie, Weinheim;又は*Enzymes in Industry: Production and Applications*、第2版(2004)、Wolfgang Aehle、23頁によって開示されている。最後の方法が好ましい。

【0096】

ピルビン酸ギ酸リアーゼI (pfIB) の発現又は活性を測定する方法は、例えば、Knappe J, Blaschkowski HP, Grobner P, Schmitt T (1974). "Pyruvate formate-lyase of *Escherichia coli*: the acetyl-enzyme intermediate." *Eur J Biochem* 1974;50(1);253-63. PMID: 4615902 ; KNAPPE, Joachim, et al. "Pyruvate Formate Lyase of *Escherichia coli*: the Acetyl Enzyme Intermediate." *European Journal of Biochemistry* 50.1 (1974): 253-263 ; Wong, Kenny K., et al. "Molecular properties of pyruvate formate-lyase activating enzyme." *Biochemistry* 32.51 (1993): 14102-14110 ; 及びNnyepi, Mbako R., Yi Peng, and Joan B. Broderick. "Inactivation of *E. coli* pyruvate formate-lyase: Role of AdhE and small molecules." *Archives of biochemistry and biophysics* 459.1 (2007): 1-9に開示されている。

10

【0097】

二機能性(二官能性)アセトアルデヒド-CoAデヒドロゲナーゼ/鉄依存性アルコールデヒドロゲナーゼ/ピルビン酸-ギ酸リアーゼデアクチバーゼ (*adhE*) の発現又は活性を測定する方法は、例えば、Membrillo-Hernandez, Jorge, et al. "Evolution of the *adhE* Gene Product of *Escherichia coli* from a Functional Reductase to a Dehydrogenase GENETIC AND BIOCHEMICAL STUDIES OF THE MUTANT PROTEINS." *Journal of Biological Chemistry* 275.43 (2000): 33869-33875 ; 及びMbako R. Nnyepi, Yi Peng, Joan B. Broderick, Inactivation of *E. coli* pyruvate formate-lyase: Role of AdhE and small molecules, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Volume 459, Issue 1, 1 March 2007, P.1-9に開示されている。

20

【0098】

リン酸アセチルトランスフェラーゼ(*pta*)の発現又は活性を測定する方法は、例えば、Dittich, Cheryl R., George N. Bennett, and Ka Yiu San. "Characterization of the Acetate Producing Pathways in *Escherichia coli*." *Biotechnology progress* 21.4 (2005): 1062-1067 ; 及びBrown, T. D. K., M. C. Jones-Mortimer, and H. L. Kornberg. "The enzymic interconversion of acetate and acetyl-coenzyme A in *Escherichia coli*." *Journal of general microbiology* 102.2 (1977): 327-336に開示されている。

30

【0099】

フマル酸レダクターゼ (*frdA*) の発現又は活性を測定する方法は、例えば、Dickie, Peter, and Joel H. Weiner. "Purification and characterization of membrane-bound fumarate reductase from anaerobically grown *Escherichia coli*." *Canadian journal of biochemistry* 57.6 (1979): 813-821 ; Cecchini, Gary, et al. "Reconstitution of quinone reduction and characterization of *Escherichia coli* fumarate reductase activity." *Journal of Biological Chemistry* 261.4 (1986): 1808-1814 ; 又はSchroder, I., et al. "Identification of active site residues of *Escherichia coli* fumarate reductase by site-directed mutagenesis." *Journal of Biological Chemistry* 266.21 (1991): 13572-13579に開示されている。

40

【0100】

アラニンラセマーゼ (*dadX*) の発現又は活性を測定する方法は、例えば、J. Wild, J. Hennig, M. Lobočka, W. Walczak, T. Kłopotowski "Identification of the *dadX* gene coding for the predominant isozyme of alanine racemase in *Escherichia coli* K12" *Mol Gen Genet* (1985) 198:315-322 and in M. Pulliam Lambert and F. C.

50

Neuhaus "Factors Affecting the Level of Alanine Racemase in Escherichia coli" Journal of Bacteriology, Mar. 1972, p. 1156-1161に開示されている。

【0101】

アラニンデヒドロゲナーゼ(alaD)の発現又は活性を測定する方法は、例えば、Sakamoto, Y., Nagata, S., Esaki, N., Tanaka, H., Soda, K. "Gene cloning, purification and characterization of thermostable alanine dehydrogenase of Bacillus stearothermophilus" J Ferment. Bioeng. 69 (1990):154-158に開示されている。

【0102】

用語「酵素の発現の低減」としては、例えば、それぞれの参照微生物、例えば前記微生物の野生型が発現するものより低いレベルでの、前記遺伝子操作された（例えば、遺伝子組換えされた）微生物による酵素の発現が含まれる。酵素の発現を低減させるための遺伝子操作としては、酵素をコードする遺伝子若しくはその一部を欠失させること、（例えば、強力なプロモーター若しくは抑制性プロモーターを除去することによって）酵素をコードする遺伝子の発現と関係がある調節配列若しくは部位を変化させる若しくは改変すること、酵素をコードする遺伝子の転写及び/若しくは遺伝子産物の翻訳に關与するタンパク質（例えば、調節タンパク質、サプレッサー、エンハンサー、転写活性化因子など）を改変すること、又は当該技術分野で慣例的な特定の遺伝子の発現を低下させる任意の他の慣用的手段（これらに限定されないが、アンチセンス核酸分子の使用若しくは標的タンパク質の発現をロックアウト若しくはブロックする他の方法が挙げられる）を挙げることができるが、これらに限定されない。さらに、mRNAに不安定化エレメントを導入してもよい、RNAのリボゾーム結合部位（RBS）の変質をもたらす遺伝子改変を導入してもよい。翻訳効率及び速度を低下させるように遺伝子のコドン用法を変化させることも可能である。

【0103】

酵素の活性の低減は、酵素の活性の低減をもたらす1つ以上の有害な遺伝子変異を導入することによって得ることもできる。さらに、酵素の活性の低減は、活性を低減すべき酵素を活性化するために必要な活性化酵素の不活性化（又は発現の低減）を含むこともできる。後者の手法によって、活性を低減すべき酵素は、好ましくは、不活性化された状況で維持される。

【0104】

本出願において有害変異は、遺伝子のコード領域によりコードされるタンパク質のタンパク質活性の低下又は除去をもたらす、プロモーター及びコード領域を含む遺伝子内の任意の変異である。そうした有害変異は、例えば、フレームシフト、コード領域中への終止コドンの導入、転写などを妨げる、TATAボックスなどのプロモーターエレメントの変異を含む。

【0105】

brnQ遺伝子によりコードされる酵素又はgcvB遺伝子によりコードされるRNAの発現及び/又は活性が低減した、あるいはargP遺伝子又はgcvA遺伝子によりコードされるタンパク質の発現及び/又は活性が増強又は増大した、あるいはlpxD遺伝子によりコードされるタンパク質の活性及び/又は発現が改変した微生物は、天然に、すなわち自発的な変異が原因で生じ得る。微生物は、化学処理又は放射線照射などの様々な技法によって、前記遺伝子の1つ以上によりコードされる酵素又はRNAの活性を喪失するように又は有意に低減、増強若しくは改変するように改変することができる。この目的のために、微生物は、例えば、変異誘発性化学薬剤、X線又はUV光で処理される。次のステップで、前記遺伝子の1つ以上によりコードされる酵素又はRNAの発現及び/又は活性が低減、増強又は改変した微生物が選択される。組換え微生物は、微生物のゲノムにおいて前記遺伝子の1つ以上を変異、破壊又は切除する、あるいは野生型遺伝子によりコードされる酵素又はRNAと比較して発現及び/若しくは活性が低減、増強又は改変している酵素又はRNAをコードする対応の遺伝子で前記遺伝子の1つ以上を置換する、ことを目的とする相同組換え技法によっても獲得可能である。

【0106】

10

20

30

40

50

本発明に係る組換え微生物の一実施形態において、brnQ遺伝子又はgcvB遺伝子によりコードされる酵素又はRNAの発現及び/又は活性の低減は、brnQ遺伝子の改変により達成することができ、この(これらの)遺伝子改変は、好ましくは、上記遺伝子の1以上又は少なくともその一部の欠失により、上記遺伝子の1以上の調節エレメント(プロモーター配列など)又はその一部の欠失により、あるいは上記遺伝子の1つ以上への少なくとも1つの有害変異の導入により、行われる。

【0107】

本発明に係る組換え微生物の一実施形態において、argP遺伝子及び/又はgcvA遺伝子によりコードされる酵素の発現及び/又は活性の増大は、argP遺伝子及び/又はgcvA遺伝子の改変により達成することができ、この(これらの)遺伝子改変は、微生物のゲノムにおけるargP遺伝子及び/又はgcvA遺伝子のコピー数の増加により、微生物への自己複製発現ベクター上の該遺伝子の導入により、強力なプロモーターへのargP遺伝子及び/又はgcvA遺伝子のプロモーターの交換により、あるいは該遺伝子の内因性プロモーターのより強力なプロモーターへの変換により(例えばプロモーター配列への点突然変異の導入により)行われる。

【0108】

さらにargP遺伝子及び/又はgcvA遺伝子及び/又はlpxD遺伝子の活性は、遺伝子の活性を改善又は改変するタンパク質におけるアミノ酸交換を達成するために遺伝子を変異させることにより増強又は改変することができる。そのような方法は当業者に公知である。

【0109】

上記遺伝子への変異は、例えば、部位特異的変異誘発又はランダム変異誘発、続いて、組換えによる微生物のゲノムへの改変遺伝子の導入によって、導入することができる。遺伝子の変異体は、PCRで遺伝子配列を変異させることにより作製することができる。「Quikchange Site-directed Mutagenesis Kit」(Stratagene)を、定方向変異誘発を行うのに使用することができる。コード配列全体、さもなければその一部のみをわたるランダム変異誘発を、「GeneMorph II Random Mutagenesis Kit」(Stratagene)を用いて実施することができる。変異誘発率は、使用する鋳型DNA量を介して所望の変異量に設定される。多重変異は、標的とされる個々の変異の組み合わせ又はいくつかの変異誘発サイクルの連続的な実施によって作製される。

【0110】

以下では、組換え、特に変異導入又は配列欠失のための好適な技術を記載する。

【0111】

この技術はまた、本明細書で「キャンベル組換え(Campbell recombination)」と称されることもある(Leenhouts et al., Appl Env Microbiol. (1989), Vol. 55, p.394-400)。本明細書で用いる「キャンベルイン(Campbell in)」とは、環状二本鎖DNA分子(例えばプラスミド)の全体が、単一の相同組換え事象(クロスイン事象)によって染色体に組み込まれ、それにより、該環状DNA分子の線状型が、該環状DNA分子の第一DNA配列に相同な染色体の第一DNA配列に効率的に挿入される、元の宿主細胞の形質転換体を意味する。「キャンベルドイン(Campbell in)」とは、「キャンベルイン」形質転換体の染色体に組み込まれている線状化DNA配列を意味する。「キャンベルイン」は、第一相同DNA配列の重複を含有し、その各コピーは、相同組換え交差点のコピーを含み、それを取り囲む。

【0112】

本明細書で用いる「キャンベルアウト(Campbell out)」とは、第二相同組換え事象(クロスアウト事象)が、「キャンベルドイン」DNAの線状化挿入DNA上に含まれる第二DNA配列と、該線状化挿入体の第二DNA配列に相同な染色体由来の第二DNA配列との間で起きている、「キャンベルイン」形質転換体の子孫である細胞を意味する。第二組換え事象は、組み込まれたDNA配列の一部の欠失(放出)をもたらすが、重要なことに、組み込まれた「キャンベルドイン」DNAの一部(これはわずか単一塩基であってもよい)の染色体中への残存ももたらし、元の宿主細胞と比べて「キャンベルアウト」細胞は、染色体に

10

20

30

40

50

おける1つ以上の意図的な変化を含有する（例えば、一塩基置換、複数塩基置換、異種遺伝子若しくはDNA配列の挿入、相同遺伝子若しくは改変相同遺伝子のさらなる1つ又は複数コピーの挿入、あるいは上に挙げたこれらの例の2つ以上を含むDNA配列の挿入）。「キャンベルアウト」細胞は、好ましくは、「キャンベルドイン」DNA配列の一部（放出されることが望ましい一部）に含まれる遺伝子（例えば、約5%～10%スクロースの存在下で増殖する細胞中で発現されると致死である、枯草菌（*Bacillus subtilis*）*sacB*遺伝子）に対する対抗選択によって得られる。対抗選択を行っても、又は行わなくても、所望の「キャンベルアウト」細胞は、任意のスクリーニング可能な表現型、例えば以下に限定されるものではないが、コロニーの形態、コロニーの色、抗生物質耐性の存在又は不在、ポリメラーゼ連鎖反応による所定のDNA配列の存在又は不在、栄養要求性の存在又は不在、酵素の存在又は不在、コロニー核酸ハイブリダイゼーション、抗体スクリーニングなどを用いて、所望の細胞をスクリーニングすることによって得る又は同定することができる。「キャンベルイン」及び「キャンベルアウト」という用語はまた、上記方法又はプロセスを参照するために、様々な時制の動詞として使用することができる。

【0113】

「キャンベルイン」又は「キャンベルアウト」をもたらず相同組換え事象が、相同なDNA配列内のDNA塩基の範囲にわたって起こり得ることが理解されており、相同な配列は少なくともこの範囲の部分では互いに同一であるため、交差事象が起きた正確な場所を特定することは通常可能ではない。言い換えると、どの配列が挿入されたDNAに由来するか、そしてどの配列が染色体DNAに由来するかを正確に特定することはできない。さらに、第一相同DNA配列及び第二相同DNA配列は、通常、部分的に非相同な領域によって分離され、「キャンベルアウト」細胞の染色体に残ったままであるのはこの非相同領域である。

【0114】

好ましくは、第一及び第二相同DNA配列は、少なくとも約200塩基対長であり、最大数千塩基対長であり得る。しかし、本方法は、より短い又はより長い配列でなされ得る。例えば、第一及び第二相同配列の長さは約500～2000塩基であることができ、「キャンベルイン」から「キャンベルアウト」を得ることは、第一及び第二相同配列をおよそ同じ長さにすることによって、好ましくは200塩基対未満で異なるように、最も好ましくは2つのうち短い方を塩基対が長い方の長さの少なくとも70%であるようにすることによって、促進される。

【0115】

一実施形態において、*brnQ*及び/又は*gcvB*遺伝子の発現及び/又は活性の低減は、分枝鎖アミノ酸トランスポーター又は非タンパク質コードRNAをそれぞれコードする*brnQ*遺伝子及び/又は*gcvB*遺伝子の不活性化により達成される。

【0116】

一実施形態において、遺伝子の不活性化は、遺伝子又は少なくともその一部の欠失により、遺伝子の調節エレメント又は少なくともその一部の欠失により、あるいは遺伝子への少なくとも1つの有害変異の導入により達成される。

【0117】

一実施形態において、*argP*の発現及び/又は活性の導入は、DNA結合/転写活性化活性を有するタンパク質をコードする*argP*遺伝子の活性化により達成される。

【0118】

一実施形態において、*gcvA*の発現及び/又は活性の導入は、DNA結合タンパク質をコードする*gcvA*遺伝子の活性化により達成される。

【0119】

本発明において使用する用語「アラニン、ピルベート、スクシネート、アスパルテート、マレート、ラクテート、バリン及び/又はロイシン」は、それらの最も広い意味で理解されるべきであり、その塩、例えば、 Na^+ 及び K^+ 塩などのアルカリ金属塩、又は Mg^{2+} 及び Ca^{2+} 塩などのアルカリ土類金属塩、又はアンモニウム塩；あるいはアラニン、ピルベート、スクシネート、アスパルテート、マレート、ラクテート、バリン及び/又はロイシンの

10

20

30

40

50

無水物も包含する。

【0120】

好ましくは、アラニン、ピルベート、スクシネート、アスパルテート、マレート、ラクテート、バリン及びノ又はロイシン、好ましくはスクシネート又はアラニン、より好ましくはアラニンを微好氣的条件下で生産する。好氣的条件又は嫌氣的条件を使用してもよい。

【0121】

微好氣的とは、酸素濃度が空気中の濃度未満であることを意味する。一実施形態において、微好氣的とは、酸素圧5~27mmHg、好ましくは10~20Hgを意味する (Megan False tta et al. (2011), The composition and metabolic phenotype of *Neisseria gonorrhoeae* biofilms, *Frontiers in Microbiology*, Vol 2, p.1-11)。好ましくは、微好氣的条件は、0.1~1vvmの気流を用いて確立される。

10

【0122】

嫌氣的条件は、慣用技術により、例えば、反応媒体の構成要素を脱気し、二酸化炭素若しくは窒素又はその混合物、必要に応じて、水素を、例えば流速0.1~1又は0.2~0.5vvmで導入することにより嫌氣的条件を維持することにより確立することができる。好氣的条件は、慣用技術により、例として、例えば流速0.1~1又は0.2~0.5vvmで空気又は酸素を導入することにより確立することができる。適当であれば、プロセス中に0.1~1.5バールのわずかな過圧を印加することができる。

【0123】

本発明の方法の一実施形態において、同化可能な炭素源は、グルコース、グリセリン、グルコース、マルトース、マルトデキストリン、フルクトース、ガラクトース、マンノース、キシロース、スクロース、アラビノース、ラクトース、ラフィノース、及びそれらの組み合わせとすることができる。

20

【0124】

好ましい実施形態において、同化可能な炭素源は、グルコース、スクロース、キシロース、アラビノース、グリセロール又はその組み合わせである。好ましい炭素源は、グルコース；スクロース；グルコース及びスクロース；グルコース及びキシロース；並びにノ又はグルコース及びアラビノース及びキシロースである。本発明に係る方法の一実施形態において、同化可能な炭素源は、スクロース、グリセリン及びノ又はグルコースでありうる。

【0125】

同化可能な炭素源の初期濃度、好ましくは初期濃度は、好ましくは、5~250g/l、好ましくは50~200g/l、より好ましくは125~150g/l、最も好ましくは約140g/lの範囲の値に調整し、培養の間に該範囲に維持することができる。反応培地のpHは、例えば、気体アンモニア、NH₄OH、NH₄HCO₃、(NH₄)₂CO₃、NaOH、Na₂CO₃、NaHCO₃、KOH、K₂CO₃、KHCO₃、Mg(OH)₂、MgCO₃、Mg(HCO₃)₂、Ca(OH)₂、CaCO₃、Ca(HCO₃)₂、CaO、CH₆N₂O₂、C₂H₇N、及びノ又はそれらの混合物などの好適な塩基の添加により制御することができる。

30

【0126】

本発明の別の実施形態は、アラニン、ピルベート、スクシネート、アスパルテート、マレート、ラクテート、バリン及びノ又はロイシン、好ましくはスクシネート又はアラニン、より好ましくはアラニン、最も好ましくはL-アラニンの発酵生産方法であって、以下のステップ：

40

- (I) 発酵槽中で上で定義した本発明に係る微生物を増殖させるステップ、及び
 (II) (I)で得られた発酵液から、アラニン、ピルベート、スクシネート、アスパルテート、マレート、ラクテート、バリン及びノ又はロイシン、好ましくはスクシネート又はアラニン、より好ましくはアラニン、最も好ましくはL-アラニンを回収するステップを含む方法である。

【0127】

本発明における発酵ステップ(I)は、例えば、攪拌発酵槽、気泡塔及びループ反応器中で行うことができる。攪拌機の種類及び幾何学的設計を含む可能な方法の種類の包括的概観は

50

、Chmiel:「Bioprozesstechnik: Einführung in die Bioverfahrenstechnik」第1巻に見出すことができる。本発明の方法において、利用できる典型的な変形は、当業者に公知の、又は例えばChmiel, Hammes and Bailey:「Biochemical Engineering」中に説明されている以下の変形、例えば、バイオマスの再循環を伴う又は伴わない、バッチ発酵、フェドバッチ(fed-batch)発酵、反復フェドバッチ発酵、又は他の連続発酵である。生産株に応じて、空気、酸素、二酸化炭素、水素、窒素又は適切な気体混合物の注入(スパージ)を、優れた収量(YP/S)を達成するために行うよい。

【0128】

方法ステップ(I)において、アラニン、ピルベート、スクシネート、アスパルテート、マレート、ラクテート、バリン及び/又はロイシン、好ましくはスクシネート又はアラニン、より好ましくはアラニン、最も好ましくはL-アラニンを生産するための特に好ましい条件は：

同化可能な炭素源：グルコース

温度：30～45

pH：6.0～7.0

微好気的条件

である。

【0129】

方法ステップ(II)では、方法ステップ(I)において得られた発酵液から産物を回収する。

【0130】

通常、回収方法は、いわゆる「バイオマス」としての発酵液から組換え微生物を分離するステップを含む。バイオマスを除去する方法は、当業者に公知であり、ろ過、沈降、浮選又はその組み合わせを含む。その結果、バイオマスを例えば遠心機、分離機、デキャンター、フィルターを用いて、又は浮選装置中で除去することができる。価値ある生成物を最大限回収するために、例えば透析ろ過の形式での、バイオマスの洗浄が望ましい場合が多い。方法の選択は、発酵液中のバイオマス含量、及びバイオマスの特性に依存し、そしてまたバイオマスと有機化合物(例えば価値ある生成物)との相互作用にも依存する。一実施形態において、発酵液を滅菌又は殺菌することができる。さらなる実施形態において、発酵液は濃縮される。必要に応じて、この濃縮はバッチ方式で又は連続的に行うことができる。圧力及び温度範囲は、第一に生成物の損傷が起こらないように、第二に必要な装置及びエネルギーの使用が最小限になるように、選択するべきである。多段蒸発法についての圧力及び温度レベルをうまく選択すると、特に、エネルギーの節約が可能となる。

【0131】

回収方法はさらに、発酵産物をさらに精製する追加の精製ステップを含んでもよい。しかしながら、発酵産物が以下に記載するように化学反応により第二の有機生成物に変換される場合には、発酵産物のさらなる精製は、反応の種類及び反応条件に応じて異なるが、必ずしも必要なわけではない。方法ステップ(II)において得られる発酵産物をさらに精製するため、当業者に公知の方法、例えば結晶化、ろ過、電気透析、及びクロマトグラフィーを用いることができる。得られる溶液を、イオン交換クロマトグラフィーによりさらに精製して、望ましくない残留イオンを除去することができる。

【0132】

一実施形態において、brnQ遺伝子の発現及び/又は活性の低減、抑制又は欠失は、野生型遺伝子への欠失の導入により達成される。好ましくは、これは配列番号1を有する野生型遺伝子又はその機能的変異体の667～764位に特異的な変異を導入することにより達成される。

【0133】

したがって、本発明のさらなる実施形態は、以下：

(6) 配列番号3の配列を含む核酸分子、又は

(7) 配列番号3の核酸分子に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、例えば少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、例えば少なくとも96%、よりさらに

10

20

30

40

50

好ましくは少なくとも97%、例えば少なくとも98%、最も好ましくは少なくとも99%の同一性を有する核酸分子、又は

(8) 中程度にストリンジェントな条件下で、より好ましくは高度にストリンジェントな条件下で、最も好ましくは非常に高度にストリンジェントな条件下で配列番号3を有する核酸分子にハイブリダイズする核酸分子、又は

(9) 配列番号4のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

(10) 配列番号4のポリペプチドに対して少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、例えば少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、例えば少なくとも85%、よりさらに好ましくは少なくとも90%、例えば少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の同一性を有するポリペプチドをコードする核酸分子

10

の群から選択される配列を有する組換え核酸分子であり、

ここで定義した変異型の遺伝子及び/又はタンパク質(但し野生型遺伝子及び/又はタンパク質ではない)を含む微生物は、発酵において改善されたアラニン収量を有する。

【0134】

一実施形態において、argP遺伝子の発現及び/又は活性の増強又は増大は、野生型遺伝子への変異の導入により達成される。好ましくは、これは、配列番号45又はその機能的変異体を有する野生型遺伝子の286~288位に特異的な変異を導入することにより達成される。

【0135】

20

したがって、本発明のさらなる実施形態は、以下：

(1) 配列番号45の配列を含む核酸分子、又は

(2) 配列番号45の核酸分子に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、例えば少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、例えば少なくとも96%、よりさらに好ましくは少なくとも97%、例えば少なくとも98%、最も好ましくは少なくとも99%の同一性を有する核酸分子、又は

(3) 中程度にストリンジェントな条件下で、より好ましくは高度にストリンジェントな条件下で、最も好ましくは非常に高度にストリンジェントな条件下で配列番号45を有する核酸分子にハイブリダイズする核酸分子、又は

(4) 配列番号46のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

30

(5) 配列番号46のポリペプチドに対して少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、例えば少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、例えば少なくとも85%、よりさらに好ましくは少なくとも90%、例えば少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の同一性を有するポリペプチドをコードする核酸分子

の群から選択される配列を有する組換え核酸分子であり、

ここで配列番号45の286~288位に対応する(1)~(5)に属する遺伝子のコドンがアミノ酸アラニンをコードせず、かつ終止コドンでないか、又は配列番号46の96位に対応する(1)~(5)に属する遺伝子によりコードされるタンパク質のアミノ酸がアラニンでなく、

上で(1)~(5)に定義される遺伝子によりコードされるタンパク質が、配列番号46を有するタンパク質と比較して増強又は増大した活性を有し、

40

上で定義した変異型の遺伝子及び/又はタンパク質を含む微生物は、発酵において改善されたアラニン収量を有する。

【0136】

好ましくは、組換え核酸分子は、以下：

(6) 配列番号47の配列を含む核酸分子、又は

(7) 配列番号47の核酸分子に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、例えば少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、例えば少なくとも96%、よりさらに好ましくは少なくとも97%、例えば少なくとも98%、最も好ましくは少なくとも99%の同一性を有する核酸分子、又は

50

(8) 中程度にストリンジェントな条件下で、より好ましくは高度にストリンジェントな条件下で、最も好ましくは非常に高度にストリンジェントな条件下で配列番号47を有する核酸分子にハイブリダイズする核酸分子、又は

(9) 配列番号48のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

(10) 配列番号48のポリペプチドに対して少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、例えば少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、例えば少なくとも85%、よりさらに好ましくは少なくとも90%、例えば少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の相同性を有するポリペプチドをコードする核酸分子

の群から選択される配列を有し、

ここで配列番号47の286~288位に対応する(7)~(10)に属する遺伝子のコドンがアミノ酸グルタミン酸又は関連するアミノ酸をコードするか、又は配列番号48の96位に対応する(7)~(10)に属する遺伝子によりコードされるタンパク質のアミノ酸がグルタミン酸又は関連するアミノ酸であり、

上で(7)~(10)に定義される遺伝子によりコードされるタンパク質が、配列番号48を有するタンパク質と比較して増強又は増大した活性を有し、

上で定義した変異型の遺伝子及び/又はタンパク質を含む微生物は、発酵において改善されたアラニン収量を有する。

【0137】

一実施形態において、gcvA遺伝子の発現及び/又は活性の増強又は増大は、野生型遺伝子のプロモーターへの変異の導入により達成される。好ましくは、これは配列番号53を有する野生型遺伝子のプロモーター又はその機能的変異体に特異的な変異を導入することにより達成され、この変異は、配列番号56又は配列番号57を生じる配列番号55に導入される変異に相当する。

【0138】

したがって、本発明のさらなる実施形態は、以下：

(11) 配列番号53の配列を含む核酸分子、又は

(12) 配列番号53の核酸分子に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、例えば少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、例えば少なくとも96%、よりさらに好ましくは少なくとも97%、例えば少なくとも98%、最も好ましくは少なくとも99%の同一性を有する核酸分子、又は

(13) 中程度にストリンジェントな条件下で、より好ましくは高度にストリンジェントな条件下で、最も好ましくは非常に高度にストリンジェントな条件下で配列番号53を有する核酸分子にハイブリダイズする核酸分子、又は

(14) 配列番号54のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

(15) 配列番号54のポリペプチドに対して少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、例えば少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、例えば少なくとも85%、よりさらに好ましくは少なくとも90%、例えば少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の相同性を有するポリペプチドをコードする核酸分子

の群から選択される配列を含む組換え核酸分子であって、

上記核酸分子とは異種の変異型プロモーター又は微生物において活性を有するプロモーターと機能的に連結されており、

上で定義した過剰発現の遺伝子及び/又はタンパク質を含む微生物は、発酵において改善されたアラニン収量を有する。

【0139】

一実施形態において、アラニン又は関連する化合物の収量及び/又は生産性の増強又は増大は、野生型IpxD遺伝子に変異を導入することにより達成される。

【0140】

したがって、本発明の一実施形態は、以下：

10

20

30

40

50

(16) 配列番号49の配列を含む核酸分子、又は

(17) 配列番号49の核酸分子に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、例えば少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、例えば少なくとも96%、よりさらに好ましくは少なくとも97%、例えば少なくとも98%、最も好ましくは少なくとも99%の同一性を有する核酸分子、又は

(18) 中程度にストリンジェントな条件下で、より好ましくは高度にストリンジェントな条件下で、最も好ましくは非常に高度にストリンジェントな条件下で配列番号49を有する核酸分子にハイブリダイズする核酸分子、又は

(19) 配列番号50のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

(20) 配列番号50のポリペプチドに対して少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、例えば少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、例えば少なくとも85%、よりさらに好ましくは少なくとも90%、例えば少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の相同性を有するポリペプチドをコードする核酸分子

10

の群から選択される配列を有する組換え核酸分子であり、

ここで配列番号49の43~45位に対応する(16)~(20)に属する遺伝子のコドンがアミノ酸アラニンをコードせず、かつ終止コドンでないか、又は配列番号50の15位に対応する(6)~(10)に属する遺伝子によりコードされるタンパク質のアミノ酸がアラニンでなく、

上で(16)~(20)に定義される遺伝子によりコードされるタンパク質が、配列番号50を有するタンパク質と比較して改変された発現及び/又は活性を有し、

20

上で定義した変異型の遺伝子及び/又はタンパク質を含む微生物は、発酵において改善されたアラニン収量を有する。

【0141】

好ましくは、組換え核酸分子は、以下：

(21) 配列番号51の配列を含む核酸分子、又は

(22) 配列番号51の核酸分子に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、例えば少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、例えば少なくとも96%、よりさらに好ましくは少なくとも97%、例えば少なくとも98%、最も好ましくは少なくとも99%の同一性を有する核酸分子、又は

(23) 中程度にストリンジェントな条件下で、より好ましくは高度にストリンジェントな条件下で、最も好ましくは非常に高度にストリンジェントな条件下で配列番号51を有する核酸分子にハイブリダイズする核酸分子、又は

30

(24) 配列番号52のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

(25) 配列番号52のポリペプチドに対して少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、例えば少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、例えば少なくとも85%、よりさらに好ましくは少なくとも90%、例えば少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の相同性を有するポリペプチドをコードする核酸分子

の群から選択される配列を有し、

ここで配列番号51の43~45位に対応する(21)~(25)に属する遺伝子のコドンがアミノ酸スレオニン又は関連するアミノ酸をコードするか、あるいは配列番号52の15位に対応する(21)~(25)に属する遺伝子によりコードされるタンパク質のアミノ酸がスレオニン又は

40

関連するアミノ酸であり、

上で(21)~(25)に定義される遺伝子によりコードされるタンパク質が、配列番号50を有するタンパク質と比較して改変された活性及び/又は発現を有し、

上で定義した変異型の遺伝子及び/又はタンパク質を含む微生物は、発酵において改善されたアラニン収量を有する。

【0142】

用語「関連するアミノ酸」又は「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸を類似の側鎖を有するアミノ酸で置き換えることを意味する。関連するアミノ酸のリストを以下の表2に示

50

す。保存的置換の表は当技術分野で周知である（例えば、Creighton (1984) Proteins. W.H. Freeman and Company (Eds)及び以下の表2参照）。

【0143】

表2: 保存的アミノ酸置換の例

残基	保存的置換	残基	保存的置換
Ala	Ser	Leu	Ile; Val
Arg	Lys	Lys	Arg; Gln
Asn	Gln; His	Met	Leu; Ile
Asp	Glu	Phe	Met; Leu; Tyr
Gln	Asn	Ser	Thr; Gly
Cys	Ser	Thr	Ser; Val
Glu	Asp	Trp	Tyr
Gly	Pro	Tyr	Trp; Phe
His	Asn; Gln	Val	Ile; Leu
Ile	Leu, Val		

10

【0144】

好ましい実施形態において、組換え核酸分子は配列番号3、47、51を有し、それぞれ配列番号4、48、52を有するタンパク質をコードする。

20

【0145】

本発明のさらなる実施形態は、以下：

(26) 配列番号4の配列を含むアミノ酸分子、又は

(27) 配列番号4のポリペプチドに対して60%、好ましくは少なくとも70%、例えば少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、例えば少なくとも85%、よりさらに好ましくは少なくとも90%、例えば少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%若しくは少なくとも99%の相同性を有するアミノ酸分子の群から選択される配列を有する組換えアミノ酸分子であり、

30

上で定義した変異型のタンパク質（但し野生型タンパク質ではない）を含む微生物は、発酵において改善されたアラニン収量を有する。

【0146】

好ましくは、本発明の組換えアミノ酸分子は配列番号4を有する。

【0147】

本発明のさらなる実施形態は、以下：

(28) 配列番号48の配列を含むアミノ酸分子、又は

(29) 配列番号48のポリペプチドに対して60%、好ましくは少なくとも70%、例えば少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、例えば少なくとも85%、よりさらに好ましくは少なくとも90%、例えば少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%若しくは少なくとも99%の相同性を有するアミノ酸分子の群から選択される配列を有する組換えアミノ酸分子であり、

40

ここで配列番号48の96位に対応する(29)に属するタンパク質のアミノ酸がグルタミン酸又は関連するアミノ酸であり、

上で(29)に定義されるタンパク質が、配列番号46を有するタンパク質と比較して増強又は増大された活性を有し、

上で定義した変異型のタンパク質（但し野生型タンパク質ではない）を含む微生物は、発酵において改善されたアラニン収量を有する。

【0148】

好ましくは、本発明の組換えアミノ酸分子は配列番号48を有する。

50

【 0 1 4 9 】

本発明のさらなる実施形態は、以下：

(30) 配列番号52の配列を含むアミノ酸分子、又は

(31) 配列番号52のポリペプチドに対して60%、好ましくは少なくとも70%、例えば少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、例えば少なくとも85%、よりさらに好ましくは少なくとも90%、例えば少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%若しくは少なくとも99%の相同性を有するアミノ酸分子の群から選択される配列を有する組換えアミノ酸分子であり、

ここで配列番号52の15位に対応する(31)に属するタンパク質のアミノ酸がスレオニン又は関連するアミノ酸であり、

上で(31)に定義されるタンパク質が、配列番号50を有するタンパク質と比較して改変された活性及び/又は発現を有し、

上で定義した変異型の遺伝子及び/又はタンパク質を含む微生物は、発酵において改善されたアラニン収量を有する。

【 0 1 5 0 】

好ましくは、本発明の組換えアミノ酸分子は配列番号52を有する。

【 0 1 5 1 】

定義

理解すべきこととして、本発明は特別な手法又はプロトコルに限定されるものでない。理解すべきこととしてまた、本明細書で使用する用語法は特定の実施形態を説明することだけを目的とし、添付した特許請求の範囲によって限定されうる本発明の範囲を限定することを意図しない。注意しなければならないこととして、本明細書及び添付した特許請求の範囲における使用で、単数形の冠詞「a」「an」及び「the」は、文脈が明確に断らない限り、複数の言及を含むものである。従って、例えば、ベクター(a vector)は1以上のベクターへの言及であり、当業者に公知のその等価物などを含むものである。本明細書で使用する用語「約」は、およそ、大雑把に、大体、又はその範囲のを意味する。用語「約」を数字の範囲と共に用いる場合、この用語は記載した数値の上限及び下限の境界を拡げることにより範囲を改変する。一般に、本明細書では用語「約」を用いて、記載した値の上限及び下限の数値を20%、好ましくは10%上方若しくは下方(高い若しくは低い)の変動によって値を改変する。本明細書で使用する用語「又は(若しくは、あるいは)」は特定のリストの任意の1つのメンバーを意味し、そのリストのメンバーの任意の組み合わせも含むものである。用語「含む(compriseとその変化形)」「含む(includeとその変化形)」は、本明細書及び以下の特許請求の範囲で使用する場合、1以上の記載した特徴、整数、成分、又はステップの存在を説明することを意図するが、これらの用語は他の特徴、整数、成分、又はステップ、又はその群の存在若しくは付加を排除するものではない。明確にするために述べると、本明細書に使用するある特定の用語は次の通り定義されかつ使用される。

【 0 1 5 2 】

コード領域：本発明で使用する用語「コード領域」は、構造遺伝子を言及して用いる場合、mRNA分子の翻訳の結果として新生ポリペプチドに見出されるアミノ酸をコードするヌクレオチド配列を意味する。コード領域は、真核生物においては、5'側にヌクレオチドトリプレット「ATG」(イニシエーターのメチオニンをコードする)と結合し、原核生物は、開始コドンとしてトリプレット「GTG」及び「TTG」も利用する。3'側に、終止コドンを表す3つのトリプレット(すなわち、TAA、TAG、TGA)の1つが結合されている。さらに、遺伝子はまた、RNA転写物に存在する配列の5'と3'末端の両方に位置する配列も含みうる。これらの配列は、「隣接(flanking)」配列又は領域と呼ばれる(これらの隣接する領域はmRNA転写物に存在する非翻訳配列に対して5'若しくは3'に位置する)。5'隣接領域は、調節配列、例えば、遺伝子の転写を制御又は影響するプロモーター及びエンハンサーを含有しうる。3'隣接領域は、転写の終結、転写後の切断及びポリアダニル化を指令する配列を含有しうる。

10

20

30

40

50

【0153】

相補性：「相補的」又は「相補性」は、アンチパラレルなヌクレオチド配列の相補的塩基残基間で水素結合が形成されると（塩基対合規則により）お互いに対合することができるアンチパラレルなヌクレオチド配列を含むものである、2つのヌクレオチド配列を意味する。例えば、配列 5'-AGT-3'は配列 5'-ACT-3'と相補的である。相補性は「部分的」であっても又は「全体」であってもよい。核酸分子間の「部分的」相補性は、1以上の核酸塩基が塩基対合規則によってマッチしない場合である。「全体」又は「完全」相補性は、それぞれ及び全ての核酸塩基が他の塩基と、塩基対合規則のもとでマッチする場合である。核酸分子鎖間の相補性の程度は、核酸分子鎖間のハイブリダイゼーションの効率と強度に有意な影響を及ぼす。本明細書で使用する核酸配列の「相補体」は、その核酸分子が核酸配列の核酸分子に対して全体相補性を示すヌクレオチド配列を意味する。

10

【0154】

内因性：「内因性」ヌクレオチド配列は、野生型微生物のゲノム中に存在するヌクレオチド配列を意味する。

【0155】

発現の増強：微生物中の核酸分子の発現の「増強」又は「増大」を本明細書では同じ意味で使用し、微生物における核酸分子の発現のレベルが、参照微生物、例えば野生型と比較して高いことを意味する。本明細書で使用する用語「増強」又は「増大」は、ここでは発現すべき核酸分子のより高い、好ましくは有意に高い発現を意味する。本明細書で使用する、作用物質、例えばタンパク質、mRNA又はRNAのレベルの「増強」又は「増大」は、実質的に同一条件のもとで増殖させた実質的に同一の微生物と比較して、そのレベルが増大したことを意味する。本明細書で使用する、標的遺伝子により発現された作用物質、例えばpreRNA、mRNA、rRNA、tRNA等の及び/又はそれがコードするタンパク質産物のレベルの「増強」又は「増大」は、そのレベルが好適な参照微生物と比較して、50%以上、例えば100%以上、好ましくは200%以上、より好ましくは5倍以上、さらにより好ましくは10倍以上、最も好ましくは20倍以上、例えば50倍増大することを意味する。その増強又は増大は、当業者が精通する方法により測定することができる。従って、核酸又はタンパク質の量の増強又は増大はタンパク質の免疫学的検出により測定することができる。さらに、タンパク質アッセイ、蛍光、ノーザンハイブリダイゼーション、ヌクレアーゼ保護アッセイ、逆転写（定量RT-PCR）、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）、ウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ（RIA）又は他のイムノアッセイ及び蛍光活性化細胞分析（FACS）などの技法を使って微生物中の特定のタンパク質又はRNAを測定することができる。誘導されるタンパク質産物の種類に応じて、微生物の表現型に与えるその活性又は効果を測定してもよい。タンパク質の量を測定する方法は当業者に公知である。記載しうる例には次のものがある：マイクロ-ビウレット法（Goa J（1953）Scand J Clin Lab Invest 5：218-222）、フォーリン-チオカルト法（Lowry OHら（1951）J Biol Chem 193：265-275）又はCBB G-250の吸収を測定する方法（Bradford MM（1976）Analyt Biochem 72：248-254）。

20

30

【0156】

発現：「発現」は、細胞における、遺伝子産物の生合成、好ましくは、ヌクレオチド配列、例えば、内因性遺伝子又は異種遺伝子の転写及び/又は翻訳を意味する。例えば、構造遺伝子の場合には、発現は構造遺伝子のmRNAへの転写及び、場合によっては、引き続いてmRNAの1以上のポリペプチドへの翻訳に関わる。他の場合では、発現はRNA分子を保持するDNAの転写だけに関わりうる。

40

【0157】

外来：用語「外来」は、細胞中に実験操作により導入された任意の核酸分子（例えば、遺伝子配列）を意味し、導入された配列がいくつかの改変（例えば、点突然変異、選択マーカー遺伝子の存在など）を含し、したがって天然の配列とは異なる限り、その細胞中に見出される配列を含み得る。

【0158】

50

機能的連結：用語「機能的連結 (functional linkage)」又は「機能的に連結した (functionally linked)」は、用語「機能可能な連結 (operable linkage)」又は「機能可能に連結した (operably linked)」と同等であり、調節エレメント (例えば、プロモーター) の発現対象の核酸配列との、及び、適宜、さらなる調節エレメント (例えば、ターミネーターなど) との配列の配置であって、それぞれの調節エレメントがその意図する機能を完遂して前記核酸配列の発現を可能にし、改変し、促進し又はさもなくば影響を与え得る前記配列の配置を意味すると理解される。同義語として、表現「機能可能な連結」又は「機能可能に連結した」を使用してもよい。発現は、核酸配列のセンス又はアンチセンスRNAと関係した配置に依存してもたらされうる。この目的にとって、化学的意味の直接連結は必ずしも必要でない。例えば、エンハンサー配列などの遺伝子制御配列は、さらに離れた位置から、又は他のDNA分子からでも、標的配列に対するその機能を果たしうる。好ましい配置は、発現対象の核酸配列が組換えによってプロモーターとして作用する配列の後方に位置し、2つの配列が互いに共有結合で連結される配置である。好ましい実施形態においては、転写開始が本発明のキメラRNAの所望の開始と同一であるように、転写すべき核酸配列をプロモーターの後ろに配置する。機能的連結、及び発現構築物は、記載された通例の組換え及びクローニング技法を用いて作製することができる (例えば、Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY); Silhavy et al. (1984) *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY); Ausubel et al., (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience; Gelvin et al., (Eds) (1990) *Plant Molecular Biology Manual*; Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands)。しかし、例えば、制限酵素に対する特異的切断部位をもつリンカーとして、又はシグナルペプチドとして作用するさらなる配列も2つの配列の間に配置することができる。配列の挿入はまた、融合タンパク質の発現をもたらしうる。好ましくは、調節領域、例えばプロモーター及び発現対象の核酸配列の連結から成る発現構築物をベクターに組込まれた形で存在させてもよく、又は例えば、形質転換によりゲノム中に挿入することができる。

10

20

【0159】

遺伝子：用語「遺伝子」は、遺伝子産物 (例えば、ポリペプチド又は機能性RNA) の発現をいくつかの方式で調節することができる適当な調節配列と機能可能に連結された領域を意味する。遺伝子は、コード領域 (オープンリーディングフレーム、ORF) に先行する (上流の) 及び後続する (下流の) DNAの非翻訳調節領域 (例えば、プロモーター、エンハンサー、リプレッサーなど) を含む。本明細書で使用する用語「構造遺伝子」は、mRNAに転写され、次いで特定のポリペプチドの特徴であるアミノ酸の配列に翻訳されるDNA配列を意味することを意図している。

30

【0160】

ゲノムとゲノムDNA：用語「ゲノム」又は「ゲノムDNA」は、宿主生物の遺伝性の遺伝子情報を意味する。前記ゲノムDNAは核様体のDNAを含むが、自己複製プラスミドのDNAも含む。

40

【0161】

異種：核酸分子又はDNAに関する用語「異種」は、天然では機能可能に連結されていない又は天然では異なる位置で機能可能に連結された第2の核酸分子と、機能可能に連結された、又は機能可能に連結されるように遺伝子操作された核酸分子を意味する。核酸分子及びそれと連結された1以上の調節核酸分子 (プロモーター又は転写終結シグナルなど) を含む異種発現構築物は、例えば、実験遺伝子操作に由来する構築物であって、(a)前記核酸分子、又は(b)前記調節核酸分子、又は(c)両方 (すなわち(a)と(b)) がその天然 (生来) の遺伝環境に位置しないか、又は、実験遺伝子操作により改変されている (改変の例は1以上のヌクレオチド残基の置換、付加、欠失、逆位又は挿入である) 前記構築物である。天然の遺伝環境は、起源の生物における天然のゲノム遺伝子座、又はゲノムライブラリー中

50

の存在を意味する。ゲノムライブラリーの場合、核酸分子の配列の天然の遺伝環境は好ましくは、少なくとも部分において保持される。前記環境は核酸配列に少なくとも1つの側において隣接し、そして少なくとも50bp、好ましくは少なくとも500bp、とりわけ好ましくは少なくとも1,000bp、非常にとりわけ好ましくは少なくとも5,000bpの長さの配列を有する。天然の発現構築物（例えば、プロモーターと対応する遺伝子との天然の組み合わせ）は、非天然、合成の「人工的」方法、例えば変異誘発により改変されると、トランスジェニック発現構築物になる。かかる方法は記載されている（米国特許第5,565,350号；WO 00/15815号）。例えば、この分子の生来のプロモーターでないプロモーターと機能可能に連結されたタンパク質をコードする核酸分子は、プロモーターについて異種であるとみなされる。好ましくは、異種DNAは、それを導入した細胞に対して内因性でないか又は天然で随伴しないが、他の細胞から得られたか又は合成されたものである。異種DNAはまた、いくつかの改変、非天然、多コピーの内因性DNA配列、又はそれに物理的に連結された他のDNA配列と天然で随伴しないDNA配列を含む内因性DNA配列を含む。一般に、必ずではないが、異種DNAはそれが発現される細胞により通常産生されないRNA又はタンパク質をコードする。

【0162】

ハイブリダイゼーション：本明細書で使用する用語「ハイブリダイゼーション」は「核酸分子の1つの鎖が塩基対合を介して相補鎖に参加する任意のプロセス」を含む（J. Coombs (1994) Dictionary of Biotechnology, Stockton Press, New York）。ハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションの強度（すなわち、核酸分子間の会合の強度）は、核酸分子間の相補性の程度、関わる条件のストリンジェンシー、形成されるハイブリッドの T_m 、及び核酸分子内のG:C比などの因子の影響を受ける。本明細書で使用する用語「 T_m 」は「融点」の意味で使用される。融点は二本鎖の核酸分子の集団が半分に解離して一本鎖になる温度である。核酸分子の T_m を計算する式は当技術分野において周知である。標準の参考文献に示されるように、核酸分子が1M NaClの水溶液中に含まれる場合、 T_m 値の単純な計算は式： $T_m=81.5+0.41(\% G+C)$ により計算することができる [例えば、Anderson and Young, Quantitative Filter Hybridization, in Nucleic Acid Hybridization (1985) を参照]。他の参考文献は、構造並びに配列の特徴を考慮に入れて T_m を計算するさらに複雑な計算を含む。ストリンジェントな条件は、当業者に公知であり、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6に記載されている。好適なハイブリダイゼーション条件は、例えば、配列の相補体の少なくとも50、好ましくは少なくとも100、より好ましくは少なくとも150、よりさらに好ましくは少なくとも200、最も好ましくは少なくとも250個の連続するヌクレオチドを含む核酸分子に対して、50 における7%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、0.5M NaPO₄、1mM EDTA中でのハイブリダイゼーションと50 における2X SSC、0.1% SDS中での洗浄に等しい条件下でハイブリダイズするもの（低ストリンジェンシー）である。他の好適なハイブリダイゼーション条件は、配列の相補体の少なくとも50、好ましくは少なくとも100、より

好ましくは少なくとも150、よりさらに好ましくは少なくとも200、最も好ましくは少なくとも250個の連続するヌクレオチドを含む核酸分子に対して、50 における7%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、0.5M NaPO₄、1mM EDTA中でのハイブリダイゼーションと50 （中程度ストリンジェンシー）又は65 （高ストリンジェンシー）における1X SSC、0.1% SDS中での洗浄である。他の好適なハイブリダイゼーション条件は、配列の相補体の少なくとも50、好ましくは少なくとも100、より好ましくは少なくとも150、よりさらに好ましくは少なくとも200、最も好ましくは少なくとも250個の連続するヌクレオチドを含む核酸分子に対して、50 における7%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、0.5M NaPO₄、1mM EDTA中でのハイブリダイゼーションと65 における0.1X SSC、0.1% SDS中での洗浄である（非常に高度なストリンジェンシー）。

【0163】

「同一性」：「同一性」は、2以上の核酸又はアミノ酸分子の比較について使用する場合

、前記分子の配列がある特定の程度の配列類似性を共有し、配列が部分的に同一であることを意味する。

【0164】

2つのアミノ酸配列又は2つの核酸分子のパーセント同一性（核酸配列を参照する場合、本明細書では相同性を互換的に使用する）を決定するために、配列の1つを他の配列の下に書いて最適な比較を行う（例えば、ギャップを一方のタンパク質又は核酸の配列中に挿入し、他のタンパク質又は他の核酸と最適なアラインメントを作り出すことができる）。

【0165】

対応するアミノ酸位置又はヌクレオチド位置のアミノ酸残基又は核酸分子を次いで比較する。もし1つの配列の1つの位置が他配列の対応する位置と同じアミノ酸残基又は同じ核酸分子により占められていれば、その分子はこの位置において同一性である。2つの配列間のパーセント同一性は、配列が共有する同一の位置の数の関数（すなわち、%同一性 = 同一の位置の数 / 位置の全数 × 100）である。用語「相同性」及び「同一性」は従って、核酸配列を参照する場合には同義語と考えるべきである。アミノ酸配列を参照する場合、「同一性」の用語は、配列中の特定の位置における同一のアミノ酸を指し、「相同性」の用語は、配列中の特定の位置における相同アミノ酸を指す。相同なアミノ酸は、類似の側鎖を有するアミノ酸である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーが当技術分野で規定されている。

10

【0166】

本発明のタンパク質に相同なタンパク質をコードする核酸分子は、1以上のアミノ酸の置換、付加又は欠失がコードされるタンパク質に導入されるように、1以上のヌクレオチド置換、付加又は欠失をヌクレオチド配列に導入することにより作製することができる。突然変異は、標準的な技術、例えば部位特異的変異誘発及びPCR介在変異誘発により、本発明の配列の1つに導入することができる。好ましくは、保存的アミノ酸置換を、1以上の予想された非必須アミノ酸残基において行う。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基を類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えたものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当技術分野において定義されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、分岐側鎖を有するアミノ酸（例えばスレオニン、バリン、イソロイシン）、及び芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が含まれる。したがって、本発明のタンパク質中の予測される非必須アミノ酸残基は、好ましくは同じ側鎖ファミリーからの別のアミノ酸残基で置き換えられる。

20

30

【0167】

あるいは、別の実施形態において、変異は、例えば飽和変異誘発（saturation mutagenesis）によりコード配列の全体又は一部においてランダムに導入することができ、得られる変異体を本明細書に記載の各活性についてスクリーニングし、その活性を保持する変異体を同定することができる。本発明の配列の1つの変異誘発後、コードされるタンパク質は組換えにより発現することができ、タンパク質の活性は、例えば本明細書に記載のアッセイを用いて決定することができる。

40

【0168】

2以上のアミノ酸又は2以上のヌクレオチド配列のパーセント同一性を確認するために、いくつかのコンピューターソフトウェアプログラムが開発されている。2以上の配列の同一性は、例えば、ソフトウェアfastaを用いて計算することができ、これは現在バージョンfasta 3が使用されている（W. R. Pearson and D. J. Lipman, PNAS 85, 2444(1988) ; W. R. Pearson, Methods in Enzymology 183, 63 (1990) ; W. R. Pearson and D. J. Lipman, PNAS 85, 2444 (1988) ; W. R. Pearson, Enzymology 183, 63 (19

50

90))。異なる配列の同一性を計算する他の有用なプログラムは標準blastプログラムであって、これはBiomax pedantソフトウェアに含まれている (Biomax、Munich、Federal Republic of Germany)。このソフトウェアは残念ながら、blastが主題及びクエリの完全な配列を常に含まないので、最適性の劣る結果をもたらすことがある。それにも関わらず、このプログラムは非常に効率的であるので、膨大な数の配列を比較するために用いることができる。以下の設定は、配列のかかる比較のための典型的に使用されるものである。

【 0 1 6 9 】

-p プログラム名 [文字列]; -d データベース [文字列]; デフォルト = nr; -i クエリーファイル[File In]; デフォルト = stdin; -e 期待値 (E) [実数]; デフォルト = 10.0
 ; -m アラインメントビューオプション: 0 = ペアワイズ; 1 = 同一性を示すクエリー-アンカー; 2 = 同一性を示さないクエリー-アンカー; 3 = フラットクエリー-アンカー、同一性を示す; 4 = フラットクエリー-アンカー、同一性を示さない; 5 = フラットクエリー-アンカー、同一性を示さない、かつ平滑末端; 6 = フラットクエリー-アンカー、同一性を示さない、かつ平滑末端; 7 = XML Blast出力; 8 = 表形式; 9 コメントラインを含む表形式[整数]; デフォルト = 0; -o BLASTリポート出力ファイル[File Out] オプション; デフォルト = stdout; -F フィルタークエリー配列 (blastnを用いるDUST、他を用いるSEG) [文字列]; デフォルト = T; -G ギャップを開くためのコスト (0はデフォルト行動を引き起こす) [整数]; デフォルト = 0; -E ギャップを拡張するためのコスト (0はデフォルト行動を引き起こす) [整数]; デフォルト = 0; -X ギャップ付加されたアラインメントに関するX下落値 (ビット) (0はデフォルト行動を引き起こす); blastn 30、megablast 20、tblastx 0、他の全部15 [整数]; デフォルト = 0; -I デフラインにGIを示す[T/F]; デフォルト = F; -qヌクレオチド不一致に関するペナルティ (blastnのみ) [整数]; デフォルト = -3; -rヌクレオチド一致に関する報酬 (blastnのみ) [整数]; デフォルト = 1; -v (V)に関する1行記述を示すデータベース配列の数 [整数]; デフォルト = 500; -b (B)に関するアラインメントを示すデータベース配列の数 [整数]; デフォルト = 250; -f 拡張ヒットに関する閾値、デフォルト 0の場合; blastp 11、blastn 0、blastx 12、tblastn 13; tblastx 13、megablast 0 [整数]; デフォルト = 0; -g ギャップ付加アラインメントを実行 (tblastxでは利用不可) [T/F]; デフォルト = T; -Q 使用するクエリー遺伝子コード[整数]; デフォルト = 1; -D D B遺伝子コード (tblast[nx]についてのみ) [整数]; デフォルト = 1; -a 使用するプロセッサの数[整数]; デフォルト = 1; -O SeqAlignファイル[File Out] オプション; -J クエリーデフラインを信じる[T/F]; デフォルト = F; -M マトリックス[文字列]; デフォルト = BLOSUM62; -W ワードサイズ、デフォルト 0の場合 (blastn 11、megablast 28、他の全部 3) [整数]; デフォルト = 0; -z データベースの有効長さ (実際のサイズについては0を使用する) [実数]; デフォルト = 0; -K 保持する領域から得られる最良のヒットの数 (デフォルトにより除去、使用する場合、100の値が推奨される) [整数]; デフォルト = 0; -P 複数ヒットについては0、単一ヒットについては1[整数]; デフォルト = 0; -Y 検索スペースの有効長さ (実際のサイズについては0を使用する) [実数]; デフォルト = 0; -S データベースに対して検索するためのクエリー・ストランド (blast[nx]、及びtblastxについて); 3は両方、1は上、2は下である[整数]; デフォルト = 3; -T HTML出力を作製 [T/F]; デフォルト = F; -I GIの一覧に対するデータベースの限定的検索 [文字列] オプション; -U FASTA配列のフィルタリングには小文字を使用する [T/F] オプション; デフォルト = F; -y ビットで示される非ギャップ付加拡張のためのX下落値 (0.0はデフォルト行動を引き起こす); blastn 20、megablast 10、他の全部 7 [実数]; デフォルト = 0.0; -Z ビットで示される最終的なギャップ付加アラインメントに関するX下落値 (0.0はデフォルト行動を引き起こす); blastn/megablast 50、tblastx 0、他の全部 25 [整数]; デフォルト = 0; -R PSI-TBLASTN チェックポイントファイル[File In] オプション; -n MegaBlast検索 [T/F]; デフォルト = F; -L クエリー配列上の位置[文字列] オプション; -A 複数ヒットウィンドウサイズ、デ

フォルト 0 の場合 (blastn/megablast 0、他の全部 40 [整数]; デフォルト = 0; -w フレームシフトペナルティ (blastxに関するOOFアルゴリズム) [整数]; デフォルト = 0; -t HSPsを連結するためにtblastnにおいて許容される最大のイントロンの長さ (0は連結不可) [整数]; デフォルト = 0。

【 0 1 7 0 】

Needleman及びWunsch、又はSmith及びWatermanのアルゴリズムを用いることにより、高品質の結果が達成される。従って、前記アルゴリズムに基づくプログラムが好ましい。有利には、配列の比較を、プログラムPileUp (J. Mol. Evolution., 25, 351 (1987)、Higgins et al., CABIOS 5, 151 (1989)) 又は、好ましくは、プログラム「Gap」及び「BestFit」(両方とも、Needleman及びWunsch (J. Mol. Biol. 48; 443-453 (1970)のアルゴリズムに基づく) 並びに「BestFit」(Smith及びWaterman (Adv. Appl. Math. 2; 482-489 (1981))のアルゴリズムに基づく)を用いて行うことができる。「Gap」及び「Needle」はGCGソフトウェアパッケージ [Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711 (1991); Altschulら(1997) Nucleic Acids Res. 25:3389 (1997)]の一部であり、「Needle」はThe European Molecular Biology Open Software Suite (EMBOSS) (Trends in Genetics 16 (6), 276 (2000))の一部である。従って、好ましくは、配列同一性のパーセントを決定する計算を、配列の全範囲にわたりプログラム「Gap」又は「Needle」を用いて行う。核酸配列の比較のための以下の標準的な調整を「Needle」について用いた: マトリックス: EDN AFULL, ギャップ_ペナルティ: 10.0、拡張_ペナルティ: 0.5。核酸配列の比較のための以下の標準的な調整を「Gap」について用いた: ギャップウエイト: 50、長さウエイト: 3、平均マッチ: 10.000、平均ミスマッチ: 0.000。

10

20

【 0 1 7 1 】

例えば、核酸レベルで配列番号1の配列と80%同一性を有するといわれる配列は、配列番号1により表される配列と上記プログラム「Needle」により上記パラメーターセットを用いて比較すると80%同一性を有する配列を意味すると理解される。好ましくは、同一性はクエリー配列、例えば配列番号1の全長に基づいて計算する。

【 0 1 7 2 】

単離された: 本明細書で使用する用語「単離された」は、材料が人手により取り出されていて、その元来の、生来の環境から離れて存在し、それ故に天然の産物でないことを意味する。単離された材料又は分子 (DNA分子又は酵素など) は精製された形態で存在しうるし又は例えば、トランスジェニック宿主細胞などの非生来の環境で存在しうる。例えば、生細胞中に存在する天然の核酸分子又はポリペプチドは単離されていないが、天然の系で共存する材料のいくつかの又は全てから分離された同じ核酸分子又はポリペプチドは単離されている。かかる核酸分子はベクターの一部でありうるし及び/又はかかる核酸分子若しくはポリペプチドは組成物の一部でありうるのであって、かかるベクター若しくは組成物が元来の環境の部分でないという点では単離されているであろう。好ましくは、核酸分子に関係して、「単離された核酸配列」のように使用される場合の「単離された」は、同定され、天然源で元来随伴している少なくとも1つの夾雑核酸分子から分離された核酸配列を意味する。単離された核酸分子は、天然で見出されるのとは異なる形態又は設定で存在する核酸分子である。対照的に、単離されていない核酸分子は、それらが天然で存在する状態で見出されたDNA及びRNAなどの核酸分子である。例えば、所与のDNA配列 (例えば、遺伝子) は宿主細胞染色体において、隣接する遺伝子の近位で見出され; RNA配列、例えば、特定のタンパク質をコードする特定のmRNA配列は細胞において、多数のタンパク質をコードする数多くの他のmRNAとの混合物として見出される。しかし、例えば配列番号1を含む単離された核酸配列は、例として挙げれば、配列番号1を通常含有する細胞中のかかる核酸配列であって、その核酸配列が天然の細胞とは異なるゲノム若しくはプラスミドの位置にあるか、又は、さもなくば、天然に見出されるのとは異なる核酸配列が隣接する前記核酸配列を含むものである。単離された核酸配列は一本鎖又は二本鎖の形態で存在しうる。単離された核酸配列をタンパク質を発現するために利用する場合、その核酸配列は

30

40

50

最小限、少なくともセンス又はコード鎖の部分を含ってもよい（すなわち、核酸配列は一本鎖であってもよい）。あるいは、センスとアンチセンス鎖の両方を含ってもよい（すなわち、核酸配列は二本鎖であってもよい）。

【0173】

非コード：用語「非コード」は、発現されるタンパク質の一部若しくは全てをコードしない核酸分子の配列を意味する。非コード配列は、限定されるものでないが、エンハンサー、プロモーター領域、3'非翻訳領域、及び5'非翻訳領域を含む。

【0174】

核酸及びヌクレオチド：用語「核酸」及び「ヌクレオチド」は天然又は合成又は人工の核酸又はヌクレオチドを意味する。用語「核酸」及び「ヌクレオチド」はデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチド又は任意のヌクレオチド類似体及びポリマー又はそれらのハイブリッドを、一本鎖若しくは二本鎖のセンス又はアンチセンス型で含む。特に断らない限り、特定の核酸配列はまた、暗示的に保存的に改変されたそれらの変異体（例えば、縮重コドン置換）及び相補配列、並びに明確に示した配列を包含する。用語「核酸」は、「遺伝子」、「cDNA」、「mRNA」、「オリゴヌクレオチド」、「核酸分子」と本明細書では互換的に使用される。ヌクレオチド類似体は、塩基、糖及び/又はリン酸塩の化学構造に改変を有するヌクレオチドを含み、前記改変には、限定されるものでないが、5-位置ピリミジン改変、8-位置プリン改変、シトシン環外アミン類における改変、5-プロモウラシルの置換など；及び限定されるものでないが、2'-位置糖改変（2'-OHがH、OR、R、ハロ、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂、又はCNから選択される基により置換された糖改変を含む）されたりボヌクレオチドが含まれる。ショートヘアピンRNA（shRNA）はまた、非天然エレメント、例えば、非天然塩基、例えばイオノシン及びキサントシン、非天然糖、例えば2'-メトキシリボース、又は非天然リン酸ジエステル結合、例えばメチルホスホネート、ホスホロチオアート及びペプチドを含みうる。

10

20

【0175】

核酸配列：表現「核酸配列」は、5'から3'末端へ読まれたデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチド塩基の一本鎖又は二本鎖のポリマーを意味する。核酸配列は染色体のDNA、自己複製プラスミド、DNA又はRNAの感染性ポリマー及び主に構造的役割を果たすDNA又はRNAを含む。「核酸配列」はまた、ヌクレオチドを表す略語、文字、記号又は言語の継続的列挙を意味する。一実施形態において、核酸は長さが通常100ヌクレオチド未満の比較的短い核酸である「プローブ」であってもよい。核酸プローブは長さが約50ヌクレオチド～長さが約10ヌクレオチドであることが多い。核酸の「標的領域」は目的のものであると同定された核酸の一部である。核酸の「コード領域」は、適当な調節配列の制御下に置かれると、配列特異的な方式で転写されかつ翻訳され、特別なポリペプチド又はタンパク質を産生する核酸の部分である。コード領域はかかるポリペプチド又はタンパク質をコードすると言われる。

30

【0176】

オリゴヌクレオチド：用語「オリゴヌクレオチド」はリボ核酸（RNA）又はデオキシリボ核酸（DNA）又はそれらの擬似体のオリゴマー又はポリマー、並びに同様に機能する非天然部分を有するオリゴヌクレオチドを意味する。かかる改変された又は置換されたオリゴヌクレオチドは、所望の特性、例えば、細胞取込みの増強、核酸標的に対する親和性の増強及びヌクレアーゼの存在のもとでの安定性の増強故に、しばしば、生来の形態よりも好ましい。オリゴヌクレオチドは、好ましくは、結合（例えば、リン酸ジエステル）又は代わる結合により互いに共役結合された2以上のヌクレオモノマーを含む。

40

【0177】

オーバーハング：「オーバーハング」は、二本鎖のオリゴヌクレオチド分子の5'-又は3'-ヒドロキシル末端の比較的短い一本鎖ヌクレオチド配列である（「伸長」「突出末端」又は「粘着性末端」とも呼ばれる）。

【0178】

ポリペプチド：用語「ポリペプチド」、「ペプチド」、「オリゴペプチド」、「ポリペ

50

チド」、「遺伝子産物」、「発現産物」及び「タンパク質」は本明細書では互換的に使用されている、連続するアミノ酸残基のポリマー又はオリゴマーを意味する。

【0179】

プロモーター:用語「プロモーター」又は「プロモーター配列」は等価であり、本明細書で使用する場合、目的のヌクレオチド配列に機能可能に連結されると目的のヌクレオチド配列のRNAへの転写を制御することができるDNA配列を意味する。プロモーターは、目的のヌクレオチド配列(mRNAへのその転写を制御する)の転写開始部位の5'(すなわち、上流)の近位に位置し、そして転写開始のためのRNAポリメラーゼ及び他の転写因子による特異的結合のための部位を提供する。プロモーターはコード領域又は5'非翻訳領域を含まない。プロモーターはそれぞれの細胞に対して異種又は相同性であってもよい。核酸分子配列は、もし外来種に由来するか、又はもし同じ種由来であってもその元来の形態から改変されていれば、生物又は第2の核酸分子配列に対して「異種」である。例えば、異種コード配列と機能可能に連結されたプロモーターという場合、そのコード配列は、そのプロモーターが由来する種と異なる種由来のコード配列、又は、もし同じ種由来であれば、そのプロモーターに天然では随伴しないコード配列(例えば、遺伝子操作で作られたコード配列又は異なるエコタイプ若しくは変種からの対立遺伝子)を意味する。好適なプロモーターは、発現が起こるべき宿主細胞の遺伝子から又は宿主に対する病原体から誘導することができる。

10

【0180】

精製された:本明細書で使用する用語「精製された」は、その天然環境から取り出され、単離されるか又は分離された分子、核酸若しくはアミノ酸配列を意味する。「実質的に精製された」分子は、それが天然で随伴する他成分の少なくとも60%を含有しない、好ましくは少なくとも75%を含有しない、そしてより好ましくは少なくとも90%を含有しない。精製された核酸配列は単離された核酸配列であってもよい。

20

【0181】

組換え体:核酸分子に関する用語「組換え体」は組換えDNA技法により産生された核酸分子を意味する。この用語はまた、天然には存在しないが、改変、変更、変異又はそうでなければ人為的に操作されている核酸分子を含む。好ましくは、「組換え核酸分子」は、天然の核酸分子とは配列において少なくとも1つの核酸が異なる非天然の核酸分子である。「組換え核酸分子」はまた、好ましくは機能可能に連結された天然ではその順で存在しない核酸分子の配列を含む「組換え構築物」を含みうる。前記組換え核酸分子を作製する好ましい方法は、クローニング技法、定方向又は非部位特異的な変異誘発、合成又は組換え技法を含みうる。

30

【0182】

有意な増大:測定技法に固有の誤差限界より大きい、例えば酵素活性、遺伝子発現、特定の産物の生産性又は収量の増大、好ましくは、対照酵素の活性、発現、生産性若しくは収量又は対照細胞における発現又は対照細胞の生産性若しくは収量の約10%又は25%、好ましくは50%又は75%、より好ましくは2倍若しくは5倍又はそれ以上の増大、より好ましくは、約10倍以上の増大を意味する。

【0183】

有意な低減:測定技法に固有の誤差限界より大きい、例えば酵素活性、遺伝子発現、特定の産物の生産性又は収量の低減、好ましくは、対照酵素の活性、発現、生産性若しくは収量又は対照細胞における発現又は対照細胞の生産性若しくは収量の少なくとも約5%又は10%、好ましくは少なくとも約20%又は25%、より好ましくは少なくとも約50%又は75%、よりさらに好ましくは少なくとも約80%又は85%、最も好ましくは少なくとも約90%、95%、97%、98%又は99%の低減を意味する。

40

【0184】

実質的に相補的な:その最も広い意味で、用語「実質的に相補的な」は、参照又は標的ヌクレオチド配列と比較してヌクレオチド配列について本明細書で使用する場合、前記参照又は標的ヌクレオチド配列の実質的に相補的なヌクレオチド配列と正確に相補的な配列の

50

間のパーセント同一性は少なくとも60%、より望ましくは少なくとも70%、より望ましくは少なくとも80%又は85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも93%、さらにより好ましくは少なくとも95%又は96%、なおさらにより好ましくは少なくとも97%又は98%、またさらにより好ましくは少なくとも99%又は最も好ましくは100%（最後の場合、この文脈では用語「同一」と等しい）であるヌクレオチド配列を意味する。（以下で特に断らなければ）好ましくは、同一性を核酸配列の少なくとも19ヌクレオチド、好ましくは少なくとも50ヌクレオチド、より好ましくは全長にわたり前記参照配列に対して評価する。配列比較は、デフォルトGAP分析を用いて、GAPのSEQWEBアプリケーション（University of Wisconsin GCG）により、Needleman及びWunsch（Needleman and Wunsch (1970) J Mol. Biol. 48: 443-453；先に定義した通り）のアルゴリズムに基づいて実施する。参照ヌクレオチド配列に「実質的に相補的な」ヌクレオチド配列は参照ヌクレオチド配列と低度ストリンジェンシー条件、好ましくは中程度ストリンジェンシー条件、最も好ましくは高度ストリンジェンシー条件（先に定義した通り）のもとでハイブリダイズする。

10

【0185】

トランスジーン：本明細書で使用する用語「トランスジーン」は、実験遺伝子操作により細胞のゲノム中に導入される任意の核酸配列を意味する。トランスジーンは「内因性DNA配列」又は「異種DNA配列」（すなわち「外来のDNA」）であってもよい。用語「内因性DNA配列」は、天然の配列に関係して何らかの改変（例えば、点突然変異、選択マーカー遺伝子の存在など）のない限り、導入される細胞において天然で見出されるヌクレオチド配列を意味する。

20

【0186】

トランスジェニック：生物に言及する場合、用語「トランスジェニック」は、組換えDNA分子によって、好ましくは目的のDNA配列と機能可能に連結された好適なプロモーターを含む組換えDNA分子によって、形質転換された、好ましくは安定して形質転換されたことを意味する。

【0187】

ベクター：本明細書で使用する用語「ベクター」は、連結されている他の核酸分子を輸送することができる核酸分子を意味する。ベクターの1つのタイプはゲノム組み込み型ベクター、すなわち、宿主細胞のゲノムDNA中に組み込むことができる「組み込みベクター」である。ベクターの他のタイプはエピソームベクター、すなわち、染色体外複製の能力があるプラスミド又は核酸分子である。機能可能に連結された遺伝子の発現を指令する能力のあるベクターを本明細書では「発現ベクター」と呼ぶ。本明細書においては、文脈からそうでないことが明らかでない限り、「プラスミド」と「ベクター」を互換的に使用する。

30

【0188】

野生型：用語「野生型」、「天然の」又は「天然の起源」は、生物に関する場合、その生物が人為的に改変、変異又はさもなくば操作が行われていないことを意味する。ポリペプチド又は核酸配列に関する場合、そのポリペプチド又は核酸配列が天然であるか、又は人為的に改変、変異若しくはさもなくば操作が行われていない少なくとも1つの天然の生物において入手できるものを意味する。

40

【0189】

微生物の野生型とは、ある遺伝子の遺伝的改変を導入する前の場合と同様の状況でゲノムが存在する微生物を指す。遺伝的改変は、例えば、遺伝子若しくはその一部の欠失、又は点変異、又は遺伝子の導入とすることができる。

【0190】

「生産」又は「生産性」の用語は当技術分野で認識され、所定時間内に所定の発酵体積で形成された発酵産物（例えばアラニン）の濃度（例えば産物kg/時/L）が含まれる。「生産の効率」という用語には、特定のレベルの生産が達成されるのに必要な時間（例えば、細胞がファインケミカルの出力の特定の速度を獲得するために要する時間）が含まれる。生産性はまた、応器容量及び時間により除算した生成産物量として定義される空時収量を

50

意味する。

【0191】

「収量」又は「産物/炭素収量」の用語は当技術分野で認識され、産物（すなわちファインケミカル）への炭素源の変換の効率が含まれる。これは一般的に、炭素源1kg当たりの産物kgとして記載される。化合物の収量又は生産を増大させることにより、所定の時間量における所定の培養量における化合物の回収される分子又は有用な回収分子の量が増大する。

【0192】

「組換え微生物」という用語には、それが由来する野生型微生物と比較して改変された又は異なる遺伝子型及び/又は表現型を示すように遺伝的に改変された微生物（例えば、遺伝的改変が微生物のコード核酸配列に影響を及ぼす）が含まれる。組換え微生物は、少なくとも1つの組換えDNA分子を含む。

10

【0193】

DNAに関する用語「組換え体」は、組換えDNA技法を使用して人為的に作製されたDNA分子を指す。この用語は、それ自体は天然には存在しないが、人為的に改変、変化、変異又は操作されたDNA分子を含む。好ましくは、「組換えDNA分子」は、少なくとも1つの核酸によって天然に存在する核酸分子と配列が異なる、非天然の核酸分子である。「組換えDNA分子」は、好ましくは機能可能に連結させた、その順序で天然に存在しない核酸分子の配列を含む「組換え構築物」を含むこともできる。前記組換えDNA分子を作製する好ましい方法は、クローニング技法、定方向若しくは非定方向変異誘発、遺伝子合成又は組換え技法を含むことができる。

20

【0194】

そのような組換えDNAの例は、異種DNA配列が挿入されたプラスミド、あるいはその組換えDNAが由来する遺伝子又はプロモーターと比較して変異されている遺伝子又はプロモーターである。変異は、当技術分野で公知の定方向変異誘発技法により、又はランダム変異誘発技術（例えば、化学剤、UV光若しくはx線変異誘発により）、あるいは定方向進化技法によって導入することができる。

【0195】

用語「定方向進化」は、本明細書において用語「代謝進化」と同義に用いられ、目的の形質を有する突然変異体の増殖を選択する選択圧をかけることを含む。選択圧は、種々の培養条件、ATP及び増殖連結選択、並びに酸化還元関連選択に基づき得る。選択圧は、連続移動接種を行うバッチ発酵又は同じ圧での連続培養を用いて実施することができる。

30

【0196】

用語「発現」又は「遺伝子発現」は、特定の遺伝子（複数可）又は特定の遺伝子ベクター構築物の転写を意味する。用語「発現」又は「遺伝子発現」は、特に、遺伝子（複数可）又は遺伝子ベクター構築物のmRNAへの転写を意味する。このプロセスは、DNAの転写及び生じたRNA産物のプロセッシングを含む。用語「発現」又は「遺伝子発現」は、mRNAの翻訳及びそれとともにコードされるタンパク質の合成、すなわちタンパク質発現を含むこともできる。

【実施例】

40

【0197】

化学物質及び一般的方法

特に示さない限り、制限消化、アガロースゲル電気泳動、核酸の精製、核酸のライゲーション、形質転換、細菌細胞の選択及び培養をはじめとする、本発明の目的のために行なわれるクローニング手順は、記載される通りに行なわれる（Sambrook et al., 1989）。組換えDNAの配列分析は、Sangerの技術（Sanger et al., 1977）を用いて、レーザー蛍光DNAシーケンサー（Applied Biosystems, Foster City, CA, USA）を用いて行なわれる。特に記載しない限り、化学物質及び試薬は、Sigma Aldrich社（Sigma Aldrich, St. Louis, USA）、Promega社（Madison, WI, USA）、Duchefa社（Haarlem, The Netherlands）又はInvitrogen社（Carlsbad, CA, USA）から入手される。制限エンドヌクレ

50

アーゼは、New England Biolabs社 (Ipswich, MA, USA) 又はRoche Diagnostics GmbH (Penzberg, Germany) からのものである。オリゴヌクレオチドは、Eurofins MW Operon社 (Ebersberg, Germany) により合成される。

【0198】

実施例1:

ackA-pta、adhE、frdABCD及びpfIB ORFの不活性化並びにalaD遺伝子のコドン最適化変異体 (alaD-gstear) によるldhA ORFの置換により、L-アラニン産生に関して大腸菌W株 (LU17032) を遺伝子操作した。

【0199】

ackA-pta、adhE、frdABCD及びpfIB ORFは、FRT隣接カナマイシン耐性カセットの挿入と、それに続くFLP組換えによる抗生物質耐性カセットの除去により不活性化された。

10

【0200】

ldhA遺伝子は、alaD-gstear及び下流FRT隣接ゼオシン耐性カセット (最終的にはFLP組換えにより除去される) により置換された。

【0201】

材料及び方法

細菌培養

大腸菌W株 (LU17032) は、Luria-Bertani (LB) 液体培地中又はLuria-Bertani固体培地上で培養した。時折、W株の同一性を確認するために、10mMスクロースを含有するM9最小寒天上にクローンを継代した。抗生物質を、15 µg/mL (カナマイシン、クロラムフェニコール)、25 µg/mL (ゼオシン) 又は3 µg/mL (テトラサイクリン) の最終濃度まで、適宜、液体培地及び固体培地に添加した。

20

【0202】

Red/ET組換え

Red/ET組換えは、Gene Bridges GmbH (www.genebridges.com) の標準的プロトコールを用いて行なった。簡潔には、Red/ET能の高い大腸菌W株を、30 °Cにて、OD600nmが約0.3になるまで好氣的に増殖させた。red遺伝子の発現は、50 µLの10% (w/v) L-アラビノースの添加及びそれに続く37 °Cまでの温度上昇により誘導した。アラビノースは、非誘導対照培養では省略した。37 °Cでの35分間のインキュベーション後、細胞を、氷冷10% (v/v) グリセロールを用いて2回洗浄し、1.35kV、10 µF、600 °Cで500ngのPCR産物を用いてエレクトロポレーションした。次に、細胞を1mL氷冷LB培地中に再懸濁し、約1.5時間、37 °Cにて好氣的に増殖させた。次に、培養物を、15 µg/mLカナマイシン (ノックアウト) 又は25 µg/mLゼオシン (ノックイン) を含有するLB寒天上に播種した。

30

【0203】

FLP組換え

隣接するFRT部位は、大腸菌染色体の改変に続くFLP組換えによる抗生物質耐性マーカーの除去を可能にした。FLP組換えは、1箇所のFRT部位 (34bp) 並びに短い隣接配列 (それぞれ約20bp) を残し、これは、カセットの増幅でのプライマー結合部位として用いられる。

【0204】

FLP組換えを行なうために、FLPリコンビナーゼをコードするプラスミド708-FLPe (表1) を、エレクトロポレーションによりRed/ET組換え体へと導入した。KanR CmR又はZeoR CmR形質転換体を用いて、0.2mL LB培養物に接種し、これを30 °Cにて3時間インキュベートした。次に、37 °Cへの温度シフト及びそれに続く37 °Cでの3時間のインキュベーションにより、FLP活性を誘導した。これらの培養物から得られた単一コロニーを、続いて、CmS及びKanS又はZeoS表現型についてスクリーニングした。

40

【0205】

DNA調製及び分析

大腸菌ゲノムDNA (gDNA) を、Gentra Puregene Yeast/Bact. Kit B (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて一晚培養物から単離した。ノックアウト又はノックインカセット

50

を保持するPCR産物を、PRECISOR高忠実性DNAポリメラーゼ (BioCat, Heidelberg) を用いて鋳型プラスミドから増幅し、分析用PCR反応は、PCR Extender System (5PRIME GmbH, Hamburg, Germany) を用いて、製造業者の推奨に従って行なった。PCRアンプリコンを、GeneJET PCR Purification Kit又はGeneJET Gel Extraction Kit (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) を用いて精製し、配列決定はGATC BioTech社 (Konstanz, Germany) 又はBioSpring社 (Frankfurt am Main, Germany) により行なわれた。

【 0 2 0 6 】

表1.プラスミド及びプライマー

	関連する特徴/オリゴ配列(5'→3')	ソース	
プラスミド			10
pRed/ET	red発現プラスミド, pSC101ベース, Tc ^R	Gene Bridges	
708-FLPe	FLPリコンビナーゼ発現プラスミド, pSC101ベース, Cm ^R	Gene Bridges	
pQZ11	クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(cat) レバンスクララーゼ(sacB)カセット, ampRを有する pUC57ベースプラスミド	Genescript	
pACYC184	大腸菌クローニングベクター, p15A ori, Cm ^R , TC ^R	NEB	
プライマー (BioSpring)	配列	配列番号	20
P395-ackA-pta-check1	5'-ACTGCGGTAGTTCTTCACTG-3'	配列番号17	
P395-ackA-pta-check2	5'-AGTACCTTTCTGGTTTAGCCG-3'	配列番号18	
P395-ackA-pta-check3	5'-GATAGCAGAAACGGAACCCAC-3'	配列番号19	
P395-ackA-pta-check4	5'-GGTGCTGTTCACTACCCG-3'	配列番号20	
P395-ackA-pta-check5	5'-TGACGAGATTACTGCTGCTG-3'	配列番号21	
P395-ackA-pta-check6	5'-ATTTCCGGTTCAGATATCCGC-3'	配列番号22	
P395-adhE-check1	5'-GGGTTGACCAGCGCAAATAAC-3'	配列番号23	
P395-adhE-check2	5'-CAGAAGTGAGTAATCTTGCTTAC-3'	配列番号24	
P395-adhE-check3	5'-GATCACTTTATCTTCGACGATAC-3'	配列番号25	
P395-adhE-check4	5'-GCGAACGTGGATAAACTGTCTG-3'	配列番号26	
P395-adhE-check5	5'-GCTCTTAAGCACCCGACGTTGAC-3'	配列番号27	30
P395-adhE-check6	5'-GTCGGCTCATTAACGGCTATTC-3'	配列番号28	
P395-frd-check1	5'-GACGGATCTCCGCCATAATC-3'	配列番号29	
P395-frd-check2	5'-TCGCCACCCGCTACTGTATC-3'	配列番号30	
P395-frd-check3	5'-CAAAGCGTTCTGACGAACCCGG-3'	配列番号31	
P395-frd-check4	5'-TGTGCGATGCACAATATCGTTG-3'	配列番号32	
P395-pflB-check1	5'-TTGGTTGGGTTGACATACTGG-3'	配列番号33	
P395-pflB-check2	5'-TGAACCTTCATCACTGATAACC-3'	配列番号34	
P395-pflB-check3	5'-TTCAAAGGAGTGAATGCGACC-3'	配列番号35	
P395-pflB-check4	5'-GTCGCGGTTATGACAATACAGG-3'	配列番号36	
P395-ldhA-check1	5'-TACCGTGCCGACGTTCAATAAC-3'	配列番号37	40
P395-ldhA-check2	5'-CATCAGCAGGCTTAGCGCAAC-3'	配列番号38	
P395-ldhA-check3	5'-ACCTTTACGCGTAATGCGTG-3'	配列番号39	
P395-ldhA-check4	5'-ACCGTTTACGCTTTCCAGCAC-3'	配列番号40	
P395-csc-check1	5'-CGAATTATCGATCTCGCTCAAC-3'	配列番号41	
P395-csc-check2	5'-CGTCTATATTGCTGAAGGTACAG-3'	配列番号42	
P395-csc-check3	5'-TCGAAGGTCCATTCACGCAAC-3'	配列番号43	
P395-csc-check4	5'-GATTCCCACCGCAACGTTAG-3'	配列番号44	

PargP_1_F	5'-ttgctggaagaagagtggctggcgatgaaca aaccggtcgactccgctgatatcggaagccct ggccaac-3'	配列番号62	
PargP_1_R	5'tcagccaacacaggagccagtcaggaagca accacgtcgccagactgtccacctgagacaactg ttacagctc-3'	配列番号63	
PargP_2_F	5'-actggatgccggtgatacglgaacg-3'	配列番号64	
PargP_2_R	5'-accactggcgcttcagtaatgcc-3'	配列番号65	
PargP_seq_F	5'-ttaccaggagcagacaacagc-3'	配列番号66	10
PargP_seq_R	5'-ggcagatcgaagtttctgctc-3'	配列番号67	
PargP-pACYC_F	5'-tatcatcgataagcttatgtaccgccgacgg cttcg-3'	配列番号68	
PargP-pACYC_R	5'-aagggcatcggtcgacgtgaggataacgcctg atatgtgc-3'	配列番号69	
PgcvA_1_F	5'-taataggttacacagtgatctaattgttaa ttcatttaacatcaaaggatatcggaagccctg ggccaac-3'	配列番号70	
PgcvA_1_R	5'-aaactcgtaaggcatttagcggtggaatcg ttagacatggctttaaacacctgagacaa ctgttacagctc-3'	配列番号71	20
PgcvA_2_F	5'-cgcagaccaattgcaaacac-3'	配列番号72	
PgcvA_2_R	5'-ctcgcgcagcagaagagctt-3'	配列番号73	
PgcvA_seq_F	5'-agcagatcaaccgtactgac-3'	配列番号74	
PgcvA_seq_R	5'-agttacgcgctcctcggt-3'	配列番号75	
PgcvA-pACYC_F	5'-tatcatcgataagcttaagtgccgccactata ggatttgc-3'	配列番号76	
PgcvA-pACYC_R	5'-aagggcatcggtcgactggtcatggtcgtac cctacg-3'	配列番号77	
PgcvB_1_F	5'-tgacgtgaaagagatggtcgaactggat cagtaattcgcgatcgcaaggtgatatc ggaagccctggccaac-3'	配列番号78	30
PgcvB_1_R	5'-attataaattgtccgttgagcttctaccagc aaatacctatagtggcgccacctgag acaactgttacagctc-3'	配列番号79	
PgcvB_seq_F	5'-gccgaattattctgctgtatgc-3'	配列番号80	
PgcvB_seq_R	5'-cacaanaagctctctgctgctgcg-3'	配列番号81	
PgcvB-pACYC_F	5'-tatcatcgataagcttggcgaactggatc agtaattgc-3'	配列番号82	
PgcvB-pACYC_R	5'-aagggcatcggtcgaccggtggaatcg ttagacatggc-3'	配列番号83	40

PbrnQ_1_F	5'-tatcgttattgtaaacgcggcgcgttctcgt ggcgttacgaagcgcgtcgatatcgg aagccctggccaac-3'	配列番号84	
PbrnQ_1_R	5'-gaacgtaagcatgcagaatagcagcg ccgtttcagactgatcgaccagccac ctgagacaactgttacagctc-3'	配列番号85	
PbrnQ_2_F	5'-ggataccgtgggcaacttccttcg-3'	配列番号86	
PbrnQ_2_R	5'-gtagaaaccaccatcgagaagccg-3'	配列番号87	10
PbrnQ_seq_F	5'-cgctgtttatctacagcctgg-3'	配列番号88	
PbrnQ_seq_R	5'-ggataaatagcggtcagcacc-3'	配列番号89	
PlpxD_1C_F	5'-catcggtaaaacctggtaagtgttctcca caaaggaatgtagtggtagttagcga tatcgggaagccctggccaac-3'	配列番号90	
PlpxD_1C_R	5'-ggtgcagttcttggcgtggcccggcgatc ttatattgatcgctaaagtcatccacctg agacaactgttacagctc-3'	配列番号91	
PlpxD_fix_F	5'-cgatcaacgaatataactcgctcgcg-3'	配列番号92	20
PlpxD_fix_R	5'-ataataacacggcctgccgcaatcg-3'	配列番号93	
PlpxD_flank_F	5'-atgctgtaggcggtaacgccat-3'	配列番号94	
PlpxD_flank_R	5'-atacgtgttaccagcttcgc-3'	配列番号95	
PlpxD-pACYC_F	5'-tatcatcgataagctaaatccgttgcca acagccagg-3'	配列番号96	
PlpxD-pACYC_R	5'-aagggcatcggtcgacaacacggcctg ccgcaatcg-3'	配列番号97	
PargP_RT_F	5'-gcccggactacagaacattacagg-3'	配列番号99	
PargP_RT_R	5'-tgagacggctgattgtgtaatgc-3'	配列番号100	30
PgcvA_RT_F	5'-ccatttaagtttcactcgcgcagc-3'	配列番号101	
PgcvA_RT_R	5'-ggcggcggaacagtttagc-3'	配列番号102	
PgcvB_RT_F	5'-taggcggtgctacattaatcactatgg-3'	配列番号103	
PgcvB_RT_R	5'-tgttgtgttgcaattggtctgc-3'	配列番号104	
PlpxD_RT_F	5'-gatatcgtcatccggcgttgc-3'	配列番号105	
PlpxD_RT_R	5'-gcacaagcctaaatgctcacgg-3'	配列番号106	
PrrsA_RT_F	5'-ctcttgccatcggatgtgccag-3'	配列番号107	
PrrsA_RT_R	5'-ccagtgtggctggtcatcctctca-3'	配列番号108	40

【 0 2 0 7 】

1.1. ackA-pta遺伝子座 - ackA-ptaの標的化

約500ngの ackA-pta PCR構築物 (1737bp) を、Red/ET能の高い大腸菌W株細胞へとエレクトロポレーションした。8種類のKanR形質転換体を、ゲノム特異的プライマーを用いるPCRにより耐性マーカーカセットの正しい組み込みに関して分析した。3種類のクローンがFLP組換えに供され、FLP組換えは材料及び方法に記載される通りに行なった (データ示さず)。

【 0 2 0 8 】

クローン確認。ackA-pta遺伝子座の不活性化及びカナマイシン耐性カセットの除去は、F

RT残痕にわたるPCRにより確認した。正しいPCRシグナルを生じた1種類のクローンは、配列決定によっても確認した(図1)。

【0209】

1.2 adhE遺伝子座 - adhEの標的化

約500ngの adhE PCR構築物(1093bp)を、 ackA-pta::FRT改変を保持するRed/ET能の高い大腸菌W株細胞へとエレクトロポレーションした。8種類のKanR形質転換体を、ゲノム特異的プライマーを用いるPCRにより耐性マーカーカセットの正しい組み込みに関して分析した。2種類のクローンがFLP組換えに供され、FLP組換えは材料及び方法に記載される通りに行なった(データ示さず)。

【0210】

クローン確認。adhE遺伝子座の不活性化及びカナマイシン耐性カセットの除去は、FRT残痕にわたるPCRにより確認した。正しいPCRシグナルを生じた1種類のクローンは、配列決定によっても確認した(図2)。

【0211】

1.3 frd遺伝子座 - frdABCDの標的化

約500ngの frdABCD PCR構築物(1093bp)を、 ackA-pta::FRT及び adhE::FRT改変を保持するRed/ET能の高い大腸菌W株細胞へとエレクトロポレーションした。8種類のKanR形質転換体を、ゲノム特異的プライマーを用いるPCRにより耐性マーカーカセットの正しい組み込みに関して分析した。1種類のクローンがFLP組換えに供され、FLP組換えは材料及び方法に記載される通りに行なった(データ示さず)。

【0212】

クローン確認。frd遺伝子座の不活性化及びカナマイシン耐性カセットの除去は、FRT残痕にわたるPCRにより確認した。正しいPCRシグナルを生じた1種類のクローンは、配列決定によっても確認した(図3)。

【0213】

1.4 pfIB遺伝子座 - pfIBの標的化

約500ngの pfIB PCR構築物(1093bp)を、 ackA-pta::FRT、 adhE::FRT及び frdABCD::FRT改変を保持するRed/ET能の高い大腸菌W株細胞へとエレクトロポレーションした。8種類のKanR形質転換体を、ゲノム特異的プライマーを用いるPCRにより耐性マーカーカセットの正しい組み込みに関して分析した。4種類のクローンがFLP組換えに供され、FLP組換えは材料及び方法に記載される通りに行なった(データ示さず)。

【0214】

クローン確認。pfIB遺伝子座の不活性化及びカナマイシン耐性カセットの除去は、FRT残痕にわたるPCRにより確認した。正しいPCRシグナルを生じた1種類のクローンは、配列決定によっても確認した(図4)。

【0215】

1.5 IdhA遺伝子座 - alaD-gstearのノックイン

約500ngの IdhA::alaD-gstear PCR構築物(1783bp)を、 ackA-pta::FRT、 adhE::FRT、 frdABCD::FRT及び pfIB::FRT改変を保持するRed/ET能の高い大腸菌W株細胞へとエレクトロポレーションした。4種類のZeoR形質転換体を、ゲノム特異的プライマーを用いるPCRにより耐性マーカーカセットの正しい組み込みに関して分析した。1種類のクローンがFLP組換えに供され、FLP組換えは材料及び方法に記載される通りに行なった(データ示さず)。

【0216】

クローン確認。alaD-gstearの組み込み及びゼオシン耐性カセットの除去は、FRT残痕にわたるPCRにより確認した。正しいPCRシグナルを生じた1種類のクローンは、配列決定によっても確認した(図5)。

【0217】

実施例2：アラニンのHPLC検出及び定量化

細胞培養培地中でのアラニン検出のために、以下のHPLC法を用いた：

10

20

30

40

50

カラム：Aminex HPX-87Cカラム（Bio-Rad社）、300×7.8mm, i.d. 粒径9 μm

移動相：0.1mol/LのCa(NO₃)₂90%、アセトニトリル10%

流速：0.6mL/分

カラム温度：60

検出：屈折率検出器

【0218】

上記の方法では、細胞培養物サンプルマトリックス中の主要な推定上の成分を、アラニンの定量化を妨げることなく、アラニンからうまく分離させることができる。

【0219】

サンプル中のアラニンの量は、外部標準較正法により決定した。0.5～10.0g/Lのアラニンを含有する標準サンプルを注入し、ピーク面積を較正のために用いた。較正曲線の線形回帰係数は、0.9995であった。

10

【0220】

サンプルは、20 μLにて一度注入する。ピーク面積を用いて、Waters LC Milleniumソフトウェアにより、サンプル中に存在する量を算出する。

【0221】

実施例3：グルコース、スクシネート、ラクテート、ホルメート、アセテート及びエタノールのHPLC検出及び定量化

用いたHPLC法：

カラム：Aminex HPX-87Hカラム（Bio-Rad社）、300×7.8mm、i.d. 粒径9 μm

20

移動相：H₂SO₄4mM

流速：0.4mL/分

カラム温度：45

検出：屈折率検出器

【0222】

アナライトの量は、外部標準較正法により決定した。0.1～38.0g/Lのグルコース、0.05～10.0g/Lのスクシネート、ラクテート、ホルメート、アセテート及びエタノールを含有する標準サンプルを注入し、ピーク面積を較正のために用いた。6種類すべての較正曲線の線形回帰係数は、0.999よりも良好であった。

【0223】

30

サンプルは、20 μLにて一度注入する。ピーク面積を用いて、Waters LC Milleniumソフトウェアにより、サンプル中に存在する量を算出する。

【0224】

実施例4：改善されたアラニン収量に関する実施例1に由来する大腸菌Wステム株の代謝的進化

大腸菌Ex1株又はQZ16株と命名された、実施例1に記載される通りのすべての突然変異を含む大腸菌ステム株を、大腸菌Ex1ステム株のアラニン収量を改善するために、代謝的進化手順のために用いた。

【0225】

代謝的進化は、以下の通りに行なった：第1及び第2進化ラウンドでは、NBS培地5%グルコース中で、それぞれ500時間及び750時間にわたって継続的進化を行なった。

40

【0226】

NBS培地：

3.5g KH₂PO₄

5.0g K₂HPO₄

3.5g (NH₄)₂HPO₄

0.25g MgSO₄·7H₂O

15mg CaCl₂·2H₂O

0.5mgチアミン

1mL微量金属ストック

50

【0227】

微量金属ストックは、0.1M HCL中、1.6g FeCl₃-6H₂O ; 0.2g CoCl₂-6H₂O ; 0.1g CuCl₂-2H₂O ; 0.2g ZnCl₂ ; 0.2g NaMoO₄-2H₂O ; 0.05g H₃BO₃を用いて調製した。

【0228】

細胞をLB平板上で画線培養し、アラニン収量について試験した。最良の大腸菌ステム株（大腸菌Ev1株又はQZ17株）は、37℃にて24時間及び48時間の5%グルコースを含むNBS培地を用いる発酵にて、84%~86%のアラニン収量を生じ、これと比較して、開始ステム株である大腸菌Ex1株は80%~83%のアラニン収量を生じた。

【0229】

大腸菌Ev1株をさらなる進化ステップのために用い、このステップは、20日間のバッチ進化として行なった。細胞のうちの5%を、37℃にて、14%グルコースを含むAM1培地中に、24時間、48時間、72時間毎などに新鮮培地に再接種した。

10

【0230】

AM1培地：

19.92mm (NH₄)₂HPO₄ = 2.6g/L MW : 132.07

7.56mm NH₄H₂PO₄ = 0.87g/L MW : 115

2.0mm KCl = 0.15g/L MW : 74.55

1.5mm MgSO₄-7H₂O = 0.37g/L MW : 246.5

15g/L硫酸アンモニウムを、最終ステップで添加した。

1mmベタイン

20

1mL微量金属ストック”

【0231】

1Lの微量金属ストックを作製するために：

微量金属ストックは、0.12M HCL中、2.4g FeCl₃-6H₂O ; 0.3g CoCl₂-6H₂O ; 0.21g CuCl₂-2H₂O ; 0.3g ZnCl₂ ; 0.27g NaMoO₄-2H₂O ; 0.068g H₃BO₃ ; 0.5g MnCl₂-4H₂Oを用いて調製した。

【0232】

この進化のために、ステム大腸菌Ev2株（QZ18株とも称される）が単離された。このステム株を、AM1培地14%グルコースを含む発酵槽中に行なわれる発酵にて試験した。ステム大腸菌Ev2株は92%~94%のアラニン収量を有し、これと比較して、同じ条件下で大腸菌Ev1株は91%~92%のアラニン収量を有した。

30

【0233】

12%グルコースを含むAM1培地中での300時間のさらなるバッチ進化ステップ及び12%グルコースを含むAM1中での引き続く10回のバッチ進化ステップ後に、ステム大腸菌Ev3株（QZ20株とも称される）が単離された。

【0234】

アラニン収量に関する試験により、ステム大腸菌Ev3株が12%グルコースを含むAM1培地中で94%~96%のアラニン収量を有し、これと比較して、同じ条件下で大腸菌Ev2株は92%~93%のアラニン収量を有したことが明らかになった。

【0235】

さらに、14%グルコースを含むAM1培地中で1000時間にわたって以前に記載されたように連続バッチ進化を大腸菌Ev3株を用いて実施して、ステム大腸菌Ev4株（QZ23株とも称される）を単離した。大腸菌Ev4株を14%グルコースを含むAM1培地中で大腸菌Ev3株と比較して試験した。ステム大腸菌Ev4株は、発酵の46時間後に、ステム大腸菌Ev3株の1.0~1.3g/(Lh)と比較して増大した、応器容量及び時間により除算した生成産物量として定義されるアラニン生産性（空時収量）2.0~2.4g/(Lh)を示した。

40

【0236】

実施例5：大腸菌Ev3株と比較したステム大腸菌Ev4株での突然変異の決定

ステム大腸菌Ev4株の増大したアラニン生産性をもたらす突然変異を決定するために、大腸菌ステム株である大腸菌Ev4株及び大腸菌Ev3株のゲノムを配列決定し、結果を比較し

50

た。

【0237】

brnQ遺伝子中の突然変異が同定され、この突然変異は、ステム大腸菌Ev3株での配列番号2を有するタンパク質をコードする配列番号1から、ステム大腸菌Ev4株での配列番号4を有するタンパク質をコードする配列番号3へと、brnQ遺伝子の配列を変化させた。

【0238】

さらに、argP遺伝子中の突然変異が同定され、この突然変異は、ステム大腸菌Ev3株での配列番号46を有するタンパク質をコードする配列番号45から、ステム大腸菌Ev4株での配列番号48を有するタンパク質をコードする配列番号47へと、argP遺伝子の配列を変化させた。

10

【0239】

さらに、gcvA遺伝子のプロモーター中の突然変異が同定され、この突然変異は、ステム大腸菌Ev3株での配列番号55から、ステム大腸菌Ev4株での配列番号56へと、gcvA遺伝子のプロモーターの配列を変化させた。アラニン収量の増強を示す別の独立した株でも、gcvA遺伝子のプロモーターの配列を配列番号55から配列番号57へ変更する別の変異が同定された。

【0240】

さらに、gcvB遺伝子のプロモーター中の突然変異が同定され、この突然変異は、ステム大腸菌Ex1株での配列番号59から、ステム大腸菌Ev1株での配列番号60へと、gcvB遺伝子のプロモーターの配列を変化させた。アラニン収量の増大を示す別の独立した株でも、gcvB遺伝子のプロモーターに、プロモーター配列を配列番号59から配列番号61へ変更する別の変異が同定された。

20

【0241】

さらに、lpxD遺伝子中の突然変異が同定され、この突然変異は、ステム大腸菌Ev3株での配列番号50を有するタンパク質をコードする配列番号49から、ステム大腸菌Ev4株での配列番号52を有するタンパク質をコードする配列番号51へと、lpxD遺伝子の配列を変化させた。

【0242】

アラニン収量及び生産性について同定された変異の重要性を決定するため、実施例1に記載した変異及びPCT/IB2014/064426に記載されている変異（上述したygaW遺伝子、zipA遺伝子、lpd遺伝子における変異、及びalaD遺伝子の発現を制御するプロモーターにおける変異を含む）を含む大腸菌株に、変異を連続的に導入した。これらの変異をアラニン生産性に対する影響について評価した。変異型遺伝子又は変異型プロモーター領域の制御下にある遺伝子の発現レベルをqPCRによりモニターした。

30

【0243】

実施例6：argP (iciA) 遺伝子におけるSNPの影響の確認

ArgP（又はiciA）は転写調節因子である。これはアルギニン輸送系に関連する遺伝子及びDNA複製に関連する遺伝子を制御する。ArgPタンパク質におけるA96E変異を生じるSNPを大腸菌QZ23株において同定し、アラニン生産性に対するその影響について評価した。

【0244】

大腸菌QZ48株の菌株構築

選択可能なクロラムフェニコール耐性マーカー及び対抗選択可能なsacBマーカー（スクロース感受性を付与する）を含むargP-cat-sacBカセットを、Phusionホットスタート高忠実性DNAポリメラーゼ（Thermo社）を用いて、プライマーPargP_1_F及びPargP_1_R（表1参照）により鑄型ベクターpQZ11（Genescript社）から増幅した。PCR産物を、プラスミド鑄型バックグラウンドを減少させるために37℃にて1時間、DpnI（NEB社）消化し、QIAquick Gel Extraction Kit（Qiagen社）を用いて1%アガロースゲルからゲル抽出した。argP SNPカセット（543bp）を、Phusionホットスタート高忠実性DNAポリメラーゼ（Thermo社）を用いて、プライマーPargP_2_F及びPargP_2_R（表1参照）でQZ23ゲノムDNAから増幅し、QIAquick PCR Purification Kit（Qiagen社）を用いて精

40

50

製した。

【0245】

Red/ET組換えのために、Genebridges Red/ET Recombination Kitを、製造業者のプロトコルに従って用いた。約200ngのargP-cat-sacBカセットを、Red/ET能の高い大腸菌QZ20株細胞へとエレクトロポレーションした。培養物を、エレクトロポレーション後の陽性形質転換体の選択のために、10 µg/mLクロラムフェニコールを含むLB寒天平板上に播種した。ゲノム特異的プライマーPargP_seq_F及びPargP_seq_R（表1参照）を用いるPCRにより、マーカーカセットの組み込みに関して、数個のコロニーをスクリーニングした。PCRで確認されたクローンを、cat-sacBマーカーカセットを置き換えるためのargP SNPカセットを用いる第2のRed/ET組換えのために用いた。培養物を、エレクトロポレーション後の陽性形質転換体の選択のために、NaClを含まず、6%スクロースを含むLB寒天平板上に播種した。cat-sacBマーカーカセットの欠損に関して、ゲノム特異的プライマーPargP_seq_F及びPargP_seq_R（表1参照）を用いて、数種類のクローンを試験した。正しいサイズのPCR産物を生じた少なくとも1種類のクローンは、配列決定（GeneWiz社）によっても確認した。バイオリアクター中で菌株を試験する前に、LB平板上にて一晩、42 °Cで、菌株から熱感受性組換え（recombineering）プラスミドpRedET（amp^r）を救済した。ArgP A96E変異を生じるSNPを、大腸菌QZ20株へと導入した。得られた株を、QZ48株と称した。

10

【0246】

大腸菌QZ48株と比較した大腸菌QZ20株の発酵試験

大腸菌QZ48株を、実験室規模のバイオリアクター中での発酵中のその性能について試験した。細胞増殖及びアラニン形成を、大腸菌QZ20株と比較してモニタリングした。

20

【0247】

前培養物を、37 °Cかつ200rpmにて一晩、20%の充填容量のLB培地を含む振盪フラスコ中で増殖させた。発酵は、500mL AM 1培地（2.6g/L (NH₄)₂HPO₄、0.87g/L NH₄H₂PO₄、0.15g/L Kill、0.37g/L MgSO₄・7H₂O、15g/L (NH₄)₂SO₄、1mMベタイン、1ml/L微量金属ストック溶液）中でDASGIP 1.5L並行バイオリアクターシステム（Eppendorf社）にて行なった。微量金属ストックは、1.6g/L FeCl₃・6H₂O；0.2g/L CoCl₂・6H₂O；0.1g/L CuCl₂・2H₂O；0.2g/L ZnCl₂；0.2g/L NaMoO₄・2H₂O；0.05g/L H₃BO₃、0.1M HCLを含んだ。140g/Lグルコースを、発酵培地中の炭素源として用いた。

30

【0248】

OD600・mLが7に相当する大腸菌細胞を、遠心分離によって回収し、5mL AM 1培地中に再懸濁した。 $\#OD600 \cdot mL = (\text{未希釈培養物のOD600}) \times (\text{培養体積(mL)})$ 。5mLの再懸濁された細胞を用いて、1.5L DASGIPバイオリアクター中の500mL培養培地に接種した。それぞれの菌株を、37 °C及び400rpm攪拌速度にて2回反復で実験した。pHを6.8に制御し、かつ発酵全体を通してアラニン前駆体としてのアンモニアを培養物に提供するために、5N NH₄OHを用いた。細胞による培地中の溶存酸素の初期消費後に発酵を好気的条件下で行なうために、発酵の間は通気せず、容器を加圧しなかった。サンプルを発酵全体を通して採取し、アラニン及びグルコース濃度についてHPLCにより分析した。

40

【0249】

QZ48株におけるArgP A96E変異がアラニン形成に強い影響を有した（図7）。46時間後のQZ20株の、反応器容量及び時間で除算した生成産物の量として定義される体積測定アラニン生産性（空時収量）は $1.15 \pm 0.06 \text{g}/(\text{Lh})$ であった。大腸菌QZ48株は46時間後に $1.51 \pm 0.01 \text{g}/(\text{Lh})$ の増大した体積測定アラニン生産性を示した（図8）。

【0250】

pACYC184-argPプラスミドの構築

argP過剰発現の影響を試験するため、プラスミドpACYC184-argP（p15 ori, CmR、1細胞当たり約15コピー）を、市販のInFusionクローニング技術（Clontech, Mountain View, CA, USA）によって構築した。最初に、ベクターpACYC184（表1）をNEB社（Ip

50

swich, MA, USA) を介して入手し、これもまたNEB社からのHindIII及びSalI制限エンドヌクレアーゼを用いて直線化した。この消化は、テトラサイクリン耐性遺伝子の大部分を除去した。それとは別に、argP ORFを、プライマーPargP-pACYC_F及びPargP-pACYC_R (表1) と共にPhusionポリメラーゼ (Thermo Scientific, Waltham, MA) を用いて、野生型大腸菌W株DNAからPCR増幅した。

【0251】

プライマーは、シームレスなクローニングを容易にするために、直線化ベクターの末端に相同な追加の15bpオーバーハングを含んだ。次に、両方とも精製された直線化ベクターバックボーン及びargPインサートを用いて、製造業者のプロトコールに従ってInFusion反応を行なった。続いて、得られたInFusion産物を、エレクトロポレーション及びLBクロラムフェニコール平板上での選択によってQZ20株を形質転換するために用いた。陽性クローンをPCRで特定し、DNA配列決定により確認し、過剰発現研究のための発酵で用いた。

10

【0252】

QZ20/pACYC184株とQZ20/pACYC184-argP株との発酵比較

前培養物を、37℃かつ200rpmにて一晩、20%の充填容量のLB培地を含む振盪フラスコ中で増殖させた。発酵は、AM 1培地中で14%グルコースを含むDASGIP 1.5L並行バイオリアクターシステムにて行なった。発酵条件は全て以前に記載したものとした。

【0253】

argP過剰発現がアラニン形成速度を加速し、発酵の20時間後のアラニン力価が高くなった (図9)。20時間後のQZ20/pACYC-argP株の、反応器容量及び時間で除算した生成産物の量として定義される体積測定アラニン生産性 (空時収量) は、pACYC184プラスミド対照を有する株の $0.61 \pm 0.02 \text{g}/(\text{Lh})$ と比較して、 $0.69 \pm 0.04 \text{g}/(\text{Lh})$ であった (図10)。

20

【0254】

実施例7: gcvA / gcvBプロモーター領域中のSNPの影響の確認

QZ58株及びQZ66株の菌株構築

gcvA-cat-sacBカセットは、プライマーPgcvA_1_F/R (表1) を用いてベクターpQZ11 (Genescript社) から増幅した。gcvA/B SNPカセット (320bp) は、プライマーPgcvA_2_F/R (表1) を用いてQZ23株のゲノムDNAから増幅した。Red/ET組み換えを既に記載した通りに行なった。PgcvA_seq_F/R配列決定プライマーを用いるコロニーPCRにより、クローンを試験した。gcvA/Bプロモーター領域中のSNPを大腸菌QZ20株へと導入し、得られた菌株は、QZ58株と称された。このSNPをQZ48株 (argP SNP) へも導入し、得られた菌株は、QZ66株と称された。

30

【0255】

QZ58株とQZ66株の発酵試験

QZ58株 (gcvA/BプロモーターSNP) を、上記の通りに発酵中のその性能について試験した。アラニン形成を、QZ20株と比較してモニタリングした。

【0256】

gcvA/BプロモーターSNPは、アラニン形成に対する有意な影響を有し、高いアラニン形成速度と、46時間後のQZ20株により産生された約54g/Lと比較して約76g/Lアラニンのアラニン力価を生じた (図11)。QZ58株の体積測定アラニン生産性は、46時間後にQZ20株における $1.15 \pm 0.06 \text{g}/(\text{Lh})$ と比較して $1.66 \pm 0.02 \text{g}/(\text{Lh})$ であった (図12)。

40

【0257】

gcvA/BプロモーターSNPもまたQZ48株におけるargP SNPの上部に付加し、得られたQZ66株をQZ48株と比較してアラニン発酵中に試験した。QZ66株におけるargP変異の上部における追加のgcvA/Bプロモーター変異によって、QZ48株と比較してアラニン形成速度が速くなり、46時間後のアラニン収量がQZ48株における約70g/Lと比較して約76g/Lと高くなった (図13)。QZ66株の体積測定アラニン生産性は、46時間後にQZ48株の $1.51 \pm 0.01 \text{g}/(\text{Lh})$ と比較して $1.65 \pm 0.08 \text{g}/(\text{Lh})$ であった (図14)。

50

【0258】

gcvA及びgcvB転写レベルのRT-qPCR分析

定量的逆転写PCRを(RT-qPCR)によって、gcvA及びgcvBの転写レベルを測定した。i Taq Universal One-Step Kit (Biorad社)を、SYBR Greenベースのワンステップ逆転写(RT)-qPCR反応のために用いた。前述の通りに行なわれた大腸菌QZ20株及び大腸菌QZ23株の並行バッチ発酵から、8時間、11時間及び28時間で培養物サンプルを採取した。サンプルを、RNAを安定化させるために直ちにRNAprotect Bacteria Reagent (Qiagen社)を用いて処理した。AurumTotal RNA Mini Kit (Biorad社)を製造業者のマニュアルに従って用いて、サンプルからRNAを抽出した。混入したゲノムDNAを除去して、qPCR中のバックグラウンドを低下させるために、DNA-free DNA Removal Kit (lifetechnologies社)を用いて単離されたRNAをさらに処理した。RNAを、 $\lambda = 260\text{nm}$ にて分光光度法で定量した。

10

【0259】

100ngの大腸菌QZ20株RNAの7段階10倍希釈系列を、以下のRT-qPCRプライマー(表1)を用いて試験した: gcvA遺伝子のためのPgcvA_RT_F/R、gcvB調節RNAのためのPgcvB_RT_F/R、並びにqPCR試験中に参照遺伝子として機能したrrsA遺伝子をコードするリボソーム16S RNAに特異的であるPrrsA_RT_F及びrrsA_RT_R。シグナル増幅効率 $90\% < E < 110\%$ 及び線形回帰因子 $R^2 > 0.985$ をもたらしたRNA希釈の好適な線形ダイナミックレンジを、それぞれのRT-qPCRプライマーセットに対して決定した。rrsAは正規化のための内部参照遺伝子としてのその好適性に関して試験され、すべての被験サンプルにわたって安定に発現されることが見出された(データ示さず)。RT-qPCR反応は、CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Biorad社)を製造業者のプロトコールに従って用いて行なった。遺伝子発現の相対的定量化は、Ct法(Livak and Schmittgen 2001)に従って内部校正因子として大腸菌QZ20株8時間RNAを用いて算出した。

20

【0260】

qPCRの結果により、8時間及び11時間の発酵後の指数増殖期においてQZ20株と比較してQZ23株におけるgcvAの過剰発現が確認された。細胞密度が下降している28時間のサンプルにおいてgcvAの下方調節が確認された(図15A)。gcvB調節タンパク質は8時間及び11時間の発酵後の指数増殖期においてQZ20株と比較してQZ23株において下方調節された。細胞密度が下降している28時間のサンプルにおいてgcvB転写の全体的な下方調節が観察された(図15B)。

30

【0261】

pACYC184-gcvA及びpACYC184-gcvBプラスミドの構築

gcvA/BプロモーターSNPはgcvAの過剰発現を生じるため、実際にgcvA過剰発現がアラニン生産性の増大を生じることを確認する必要があった。したがって、プラスミドpACYC184-gcvAを、市販のInFusionクローニング技術(Clontech, Mountain View, CA, USA)によって構築した。最初に、ベクターpACYC184(表1)をNEB社(Ipswich, MA, USA)を介して入手し、これもまたNEB社からのHindIII及びSall制限エンドヌクレアーゼを用いて直線化した。この消化は、テトラサイクリン耐性遺伝子の大部分を除去した。それとは別に、gcvA ORFを、プライマーPgcvA-pACYC_F及びPgcvA-pACYC_R(表1)と共にPhusionポリメラーゼ(Thermo Scientific, Waltham, MA)を用いて、野生型大腸菌W株DNAからPCR増幅した。同様に、gcvB過剰発現の影響を試験するため、プラスミドpACYC184-gcvBを構築した。gcvB転写ユニットをプライマーPgcvB-pACYC_F及びPgcvB-pACYC_R(表1)を用いてPCR増幅した。

40

【0262】

プライマーは、シームレスなクローニングを容易にするために、直線化ベクターの末端に相同な追加の15bpオーバーハングを含んだ。次に、両方とも精製された直線化ベクターバックボーンとgcvA及びgcvBインサートを用いて、製造業者のプロトコールに従ってInFusion反応を行なった。続いて、得られたInFusion産物を、エレクトロポレーション及びLBクロラムフェニコール平板上での選択によってQZ20株を形質転換するために用いた。陽

50

性クローンをPCRで特定し、DNA配列決定により確認し、過剰発現研究のための発酵で用いた。

【0263】

QZ20/pACYC184株、QZ20/pACYC184-gcvA株及びQZ20/pACYC-gcvB株の間の発酵比較

前培養物を、37℃かつ200rpmにて一晚、20%の充填容量のLB培地を含む振盪フラスコ中で増殖させた。発酵は、AM 1培地中で14%グルコースを含むDASGIP 1.5L並行バイオリアクターシステムにて行なった。発酵条件は全て以前に記載したものとした。

【0264】

発酵試験により、プラスミドpACYC184-gcvAからのgcvAの過剰発現が、空プラスミド対照と比較して高いアラニン形成速度及び力価を生じたことが確認された(図16)。対照的に、プラスミドpACYC184-gcvBからのgcvB小調節性RNAの過剰発現は、アラニン形成速度及び力価の有意な低減を生じた。大腸菌QZ20/pACYC184-gcvA株は、プラスミド対照を有するQZ20株の $1.18 \pm 0.08 \text{g}/(\text{Lh})$ と比較して体積測定アラニン生産性 $1.50 \pm 0.09 \text{g}/(\text{Lh})$ を示した。大腸菌QZ20/pACYC184-gcvB株は、プラスミド対照と比較して低減した体積測定アラニン生産性 $0.89 \pm 0.01 \text{g}/(\text{Lh})$ を示した(図17)。

10

【0265】

QZ20 gcvBノックアウトQZ71株の菌株構築

プラスミドpACYC184-gcvBからの調節性RNA gcvBの過剰発現がアラニン生産性の有意な低減を生じたため、gcvBをQZ20株においてノックアウトし、性能について試験した。gcvB-cat-sacBカセットは、プライマーPgcvB_1_F/R(表1)を用いてベクターpQZ11(Genescript社)から増幅した。gcvB欠失カセット(400bp)は、IDTからdsDNA gBlockとして注文した(配列番号98)。Red/ET組み換えは、上記の通りに行なった。PgcvB_seq_F/R配列決定プライマーを用いるコロニーPCRにより、クローンを試験した。大腸菌QZ20株にgcvB欠失を導入し、得られた株をQZ71株と称した。

20

【0266】

QZ71株の発酵試験

QZ71株(gcvBノックアウト)を、以前に記載したように発酵中のその性能について試験した。アラニン形成を、QZ20株と比較してモニタリングした。

【0267】

QZ20株からのgcvB調節性RNAの欠失は、QZ20株と比較して、アラニン力価の増大を生じた(図18)。QZ71株の体積測定アラニン生産性は、46時間後にQZ20株の $1.15 \pm 0.06 \text{g}/(\text{Lh})$ と比較して $1.28 \pm 0.05 \text{g}/(\text{Lh})$ だった(図19)。

30

【0268】

実施例8: brnQ遺伝子中の欠失(667-764)の影響の確認

BrnQは、ロイシン、バリン及びイソロイシンをナトリウム/分枝鎖アミノ酸輸送体(symporter)として細胞中に運搬する推定439アミノ酸の分枝鎖アミノ酸トランスポーターである。QZ23株では、リーディングフレームのシフトを生じる97bpの欠失(667-764)を同定した。439アミノ酸タンパク質の最初の222アミノ酸は改変されないが、31アミノ酸がフレームシフトにより変化し、終止コドンを生じることに起因して残りのC末端鎖がトランケートされる。QZ23株中のbrnQ遺伝子に見出された97bpの部分欠失はBrnQ活性の無効を生じると推定されたため、brnQ部分欠失に加えてbrnQ遺伝子の完全な欠失(ノックアウト)を試験した。

40

【0269】

QZ57株及びQZ69株の菌株構築

brnQ-cat-sacBカセットは、プライマーPbrnQ_1_F/R(表1)を用いてベクターpQZ11(Genescript社)から増幅した。brnQ部分欠失カセット(462bp)は、プライマーPbrnQ_2_F/R(表1)を用いてQZ23株のゲノムDNAから増幅した。brnQ KOカセット(500bp)は、IDTからdsDNA gBlockとして注文した(配列番号117)。Red/ET組み換えは、上記の通りに行なった。PbrnQ_seq_F/R配列決定プライマーを用いるコロニーPCRに

50

より、クローンを試験した。大腸菌QZ20株にbrnQ部分欠失を導入し、得られた株をQZ57株と称した。大腸菌QZ20株にbrnQ完全欠失を導入し、得られた株をQZ69株と称した。

【0270】

QZ57株及びQZ69株の発酵試験

QZ57株 (brnQ 667-764) 及びQZ69株 (brnQ KO) を、以前に記載したように発酵中のその性能について試験した。アラニン形成を、QZ20株と比較してモニタリングした。

【0271】

QZ57株における97bpのbrnQ欠失及び完全brnQノックアウトは同等の性能であった。両方が、QZ20株よりも高いアラニン形成及びアラニン力価を生じた (図20)。QZ57株の体積測定アラニン生産性は、46時間後にQZ20株の $1.15 \pm 0.06 \text{g}/(\text{Lh})$ と比較して $1.30 \pm 0.04 \text{g}/(\text{Lh})$ であり、QZ69株の生産性は $1.28 \text{g}/(\text{Lh})$ だった (図21)。

10

【0272】

実施例9：lpxD遺伝子中のSNPの影響の確認

QZ23株において、コードされる酵素のA15T変異を生じるlpxD遺伝子中のSNPが検出された。LpxDによりコードされるUDP-3-O-(3-ヒドロキシミリストール)グルコサミン-N-アセチルトランスフェラーゼは、リピドAの生合成に關与する必須酵素である。リピドAは、大腸菌の外膜リポ多糖 (LPS) の不可欠な部分である。

【0273】

QZ56株及びQZ70株の菌株構築

lpxD-cat-sacBカセットは、プライマーPlpxD_1C_F/R (表1) を用いてベクターpQZ11 (Genescript社) から増幅した。lpxD SNPカセット (2588bp) は、プライマーlpxD_fix_F/R (表1) を用いてQZ23株のゲノムDNAから増幅した。Red/ET組み換えは、上記の通りに行なった。PlpxD_flank_F/R配列決定プライマーを用いるコロニーPCRにより、クローンを試験した。大腸菌QZ20株にlpxD SNPを導入し、得られた株をQZ56株と称した。大腸菌QZ68株 (argP SNP, gcvA/BプロモーターSNP, brnQ 667-764) にlpxD SNPを導入し、得られた株をQZ70株と称した。

20

【0274】

QZ56株及びQZ70株の発酵試験

QZ56株 (lpxD SNP) を、上記の通りに発酵中のその性能について試験した。アラニン形成を、QZ20株と比較してモニタリングした。QZ56株におけるLpxD A15T変異は、QZ20株と比較して増大したアラニン力価を生じた (図22)。QZ56株の体積測定アラニン生産性は、46時間後のQZ20株における $1.15 \pm 0.06 \text{g}/(\text{Lh})$ と比較して、 $1.34 \pm 0.06 \text{g}/(\text{Lh})$ であった (図23)。

30

【0275】

QZ68株 (argP SNP, gcvA/BプロモーターSNP, brnQ 667-764) にlpxD SNPもまた導入し、得られたQZ70株をQZ68株と比較してアラニン発酵中に試験した。LpxD A15T変異はアラニン形成に強い影響を及ぼした。QZ68株とQZ70株のアラニン形成速度は同等であるが、QZ68株のアラニン力価がおよそ $75 \text{g}/\text{L}$ でプラトーに達したのに対し、QZ70株におけるアラニン形成は培地中のすべてのグルコースが消費されるまで継続し、約37時間後にアラニン力価は $102 \text{g}/\text{L}$ に達した (図24)。QZ70株の体積測定アラニン生産性は、46時間後にQZ68株の $1.64 \pm 0.03 \text{g}/(\text{Lh})$ と比較して $2.24 \pm 0.002 \text{g}/(\text{Lh})$ だった (図25)。

40

【0276】

実施例10：dadX遺伝子が欠失した大腸菌株の構築は、L-アラニンの中のSNPの影響の高い鏡像体過剰率をもたらす

大腸菌QZ23株のゲノムからアラニンラセマーゼdadX遺伝子 (配列番号118) を欠失させることによって、大腸菌QZ30株を構築した。dadX ORFは、FRT隣接カナマイシン耐性カセットの挿入と、それに続く上記FLP組換えによる抗生物質耐性カセットの除去により不活性化された。Genebridges Red/ET組み換えキットを、製造業者のプロトコルに従って用いた。FRT隣接カナマイシンカセットを、各々がカナマイシン耐性カセットの挿入の

50

ためにdadX ORFに対して50 bpの相同性領域を含むプライマーPdax_KO_F (配列番号122) 及びPdax_KO_R (配列番号123) を用いて、pRED/ETプラスミド (Gene Bridges) から増幅した。dadX ORFの欠失の成功を、プライマーPdax_seq_F (配列番号124) 及びPdax_seq_R (配列番号125) を用いるPCRによりチェックし、ゲノム領域の配列決定により確認した。

【0277】

不活性化dadX遺伝子を有する大腸菌QZ30株を、インタクトなdadXを有する大腸菌QZ23と比較してラボスケールのバイオリアクターで培養し、形成されたアラニンをキラリティーについて試験した。

【0278】

前培養物を、37 °Cかつ200rpmにて一晩、20%の充填容量のLB培地を含む振盪フラスコ中で増殖させた。発酵は、500mL AM 1培地 (2.6g/L (NH₄)₂HPO₄、0.87g/L NH₄H₂PO₄、0.15g/L KCl、0.37g/L MgSO₄・7H₂O、15g/L (NH₄)₂SO₄、1mMベタイン、1ml/L微量金属ストック溶液) 中でDASGIP 1.5L並行バイオリアクターシステム (Eppendorf社) にて行なった。微量金属ストックは、1.6g/L FeCl₃・6H₂O ; 0.2g/L CoCl₂・6H₂O ; 0.1g/L CuCl₂・2H₂O ; 0.2g/L ZnCl₂ ; 0.2g/L NaMoO₄・2H₂O ; 0.05g/L H₃BO₃、0.1M HCLを含んだ。140g/Lグルコースを、発酵培地中の炭素源として用いた。

【0279】

OD600・mLが7に相当する大腸菌細胞を、遠心分離によって回収し、5mL AM 1培地中に再懸濁した。 $\#OD600 \cdot mL = (\text{未希釈培養物のOD600}) \times (\text{培養体積(mL)})$ 。5mLの再懸濁された細胞を用いて、1.5L DASGIPバイオリアクター中の500mL培養培地に接種した。それぞれの菌株を、37 °C及び400rpm攪拌速度にて2回反復で実験した。pHを6.8に制御し、かつ発酵全体を通してアラニン前駆体としてのアンモニアを培養物に提供するために、5N NH₄OHを用いた。細胞による培地中の溶存酸素の初期消費後に発酵を好気的条件下で行なうために、発酵の間は通気せず、容器を加圧しなかった。サンプルを発酵全体を通して採取し、アラニン濃度及びキラリティーについてHPLCにより分析した。

不活性化されたdadX遺伝子を有する大腸菌QZ30株が、インタクトなdadXを有する大腸菌QZ23と比べて、より高いL-アラニン>95%の鏡像体過剰率 (ee) でアラニンを一貫して産生したことが見出された (図26)。培養の20時間後、QZ30は、QZ23によって産生された82.5%と比較して、98.09%の鏡像体過剰率でL-アラニンを産生した。培養の34時間後、QZ23の81.65%と比較して、QZ30によって産生されたL-アラニンのeeは97.27%であり、培養の42時間後、QZ23によって産生された82.2%と比較して、QZ30によって産生されたL-アラニンのeeは97.49%であった。

本開示は以下の実施形態を包含する。

[1] 以下の核酸分子:

(I) 配列番号3、45、49、56、57、60若しくは61の(塩基)配列を含む核酸分子、又は

(II) 配列番号3、45、49、56、57、60若しくは61の核酸分子に対して少なくとも80%の同一性を有する核酸分子、又は

(III) ストリンジェントな条件下で配列番号3、45、49、56、57、60若しくは61(の塩基配列)を有する核酸分子の相補体にハイブリダイズする核酸分子、又は

(IV) 配列番号4、46若しくは50のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

(V) 配列番号4、46若しくは50のポリペプチドに対して少なくとも60%の相同性を有するポリペプチドをコードする核酸分子

の群より選択される配列を有する組換え核酸分子であって、

配列番号45の286~288位に対応する(I)~(V)に属する遺伝子のコドンがアミノ酸アラニンをコードせず、かつ終止コドンでないが、又は配列番号46の96位に対応する(I)~(V)に属する遺伝子によりコードされるタンパク質のアミノ酸がアラニンでなく、かつ終止コドンでなく、かつ

配列番号49の43~45位に対応する(I)~(V)に属する遺伝子のコドンがアミノ酸アラニン

10

20

30

40

50

のうちの少なくとも1つを含む組換え微生物であって、

配列番号49の43～45位に対応する(I)～(V)に属する遺伝子のコドンがアミノ酸アラニンをコードせず、かつ終止コドンでないか、又は配列番号50の15位に対応する(I)～(V)に属する遺伝子によりコードされるタンパク質のアミノ酸がアラニンでなく、かつ終始コドンでない、上記組換え微生物。

[1.1] brnQ遺伝子が、以下の核酸分子：

- (i) 配列番号1の(塩基)配列を含む核酸分子、又は
- (ii) 配列番号1の核酸分子に対して少なくとも80%の同一性を有する核酸分子、又は
- (iii) ストリンジェントな条件下で配列番号1(の塩基配列)を有する核酸分子の相補体にハイブリダイズする核酸分子、又は
- (iv) 配列番号2のポリペプチドをコードする核酸分子、又は
- (v) 配列番号2のポリペプチドに対して少なくとも60%の同一性を有するポリペプチドをコードする核酸分子

の群から選択される、実施形態10に記載の組換え微生物。

[1.2] argP遺伝子が、以下の核酸分子：

- (i) 配列番号45の(塩基)配列を含む核酸分子、又は
- (ii) 配列番号45の核酸分子に対して少なくとも80%の同一性を有する核酸分子、又は
- (iii) ストリンジェントな条件下で配列番号45(の塩基配列)を有する核酸分子の相補体にハイブリダイズする核酸分子、又は
- (iv) 配列番号46のポリペプチドをコードする核酸分子、又は
- (v) 配列番号46のポリペプチドに対して少なくとも60%の同一性を有するポリペプチドをコードする核酸分子

の群から選択される、実施形態10に記載の組換え微生物。

[1.3] gcvA遺伝子が、以下の核酸分子：

- (i) 配列番号53の(塩基)配列を含む核酸分子、又は
- (ii) 配列番号53の核酸分子に対して少なくとも80%の同一性を有する核酸分子、又は
- (iii) ストリンジェントな条件下で配列番号53(の塩基配列)を有する核酸分子の相補体にハイブリダイズする核酸分子、又は
- (iv) 配列番号54のポリペプチドをコードする核酸分子、又は
- (v) 配列番号54のポリペプチドに対して少なくとも60%の同一性を有するポリペプチドをコードする核酸分子

の群から選択される、実施形態10に記載の組換え微生物。

[1.4] gcvB遺伝子が、以下の核酸分子：

- (i) 配列番号58の(塩基)配列を含む核酸分子、又は
- (ii) 配列番号58の核酸分子に対して少なくとも80%の同一性を有する核酸分子、又は
- (iii) ストリンジェントな条件下で配列番号58(の塩基配列)の相補体にハイブリダイズする核酸分子

の群から選択される、実施形態10に記載の組換え微生物。

[1.5] 実施形態1～3のいずれかに規定される組換え核酸分子又は実施形態8に記載の組換え発現構築物又は実施形態9に記載の組換えベクターのうちの少なくとも1つを含む、組換え微生物。

[1.6] alaD遺伝子の活性及び/又は発現の導入、増大又は増強をさらに含む、実施形態10～15のいずれかに記載の組換え微生物。

[1.7] pf1B遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失をさらに含む、実施形態10～16のいずれかに記載の組換え微生物。

[1.8] adhE遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失をさらに含む、実施形態10～17のいずれかに記載の組換え微生物。

[1.9] ldhA遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失をさらに含む、実施形態10～18のいずれかに記載の組換え微生物。

[2.0] pta遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失をさらに含む、実施形態10

10

20

30

40

50

～19のいずれかに記載の組換え微生物。_____

[2.1] ackA遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失をさらに含む、実施形態10～20のいずれかに記載の組換え微生物。_____

[2.2] frdA遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失をさらに含む、実施形態10～21のいずれかに記載の組換え微生物。_____

[2.3] dadX遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失をさらに含む、実施形態10～22のいずれかに記載の組換え微生物。_____

[2.4] ygaW遺伝子の活性及び/又は発現の導入、増大又は増強をさらに含む、実施形態10～23のいずれかに記載の組換え微生物。_____

[2.5] zipA遺伝子の活性及び/又は発現の導入、増大又は増強をさらに含む、実施形態10～24のいずれかに記載の組換え微生物。_____

[2.6] lpd遺伝子の活性及び/又は発現の導入、増大又は増強をさらに含む、実施形態10～25のいずれかに記載の組換え微生物。_____

[2.7] alaD遺伝子が、以下の核酸分子：

_____(EE) 配列番号15の(塩基)配列を含む核酸分子、又は

_____(FF) 配列番号15の核酸分子に対して少なくとも80%の同一性を有する核酸分子、又は

_____(GG) ストリンジェントな条件下で配列番号15(の塩基配列)を有する核酸分子の相補体にハイブリダイズする核酸分子、又は

_____(HH) 配列番号16のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

_____(II) 配列番号16のポリペプチドに対して少なくとも60%の相同性を有するポリペプチドをコードする核酸分子

からなる群より選択される、実施形態16～26のいずれかに記載の組換え微生物。_____

[2.8] alaD遺伝子が、配列番号115若しくは116を有するプロモーター、又は以下の核酸分子： (I) 配列番号115若しくは116の核酸分子に対して少なくとも80%の同一性を有する核酸分子、又は

_____(II) 中程度にストリンジェントな条件下で配列番号115若しくは116(の塩基配列)を有する核酸分子にハイブリダイズする核酸分子、又は

_____(III) 配列番号115(の塩基配列)を有する核酸分子の少なくとも10個のヌクレオチドの断片

に機能可能に連結されている、実施形態16～26のいずれかに記載の組換え微生物。_____

[2.9] pflB遺伝子が、以下の核酸分子：

_____(A) 配列番号5の(塩基)配列を含む核酸分子、又は

_____(B) 配列番号5の核酸分子に対して少なくとも80%の同一性を有する核酸分子、又は

_____(C) ストリンジェントな条件下で配列番号5(の塩基配列)を有する核酸分子の相補体にハイブリダイズする核酸分子、又は

_____(D) 配列番号6のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

_____(E) 配列番号6のポリペプチドに対して少なくとも60%の相同性を有するポリペプチドをコードする核酸分子

からなる群より選択される、実施形態17～28のいずれかに記載の組換え微生物。_____

[3.0] adhE遺伝子が、以下の核酸分子：

_____(F) 配列番号7の(塩基)配列を含む核酸分子、又は

_____(G) 配列番号7の核酸分子に対して少なくとも80%の同一性を有する核酸分子、又は

_____(H) ストリンジェントな条件下で配列番号7(の塩基配列)を有する核酸分子の相補体にハイブリダイズする核酸分子、又は

_____(I) 配列番号8のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

_____(J) 配列番号8のポリペプチドに対して少なくとも60%の相同性を有するポリペプチドをコードする核酸分子

からなる群より選択される、実施形態18～29のいずれかに記載の組換え微生物。_____

[3.1] ldhA遺伝子が、以下の核酸分子：

_____(K) 配列番号9の(塩基)配列を含む核酸分子、又は

10

20

30

40

50

____ (L) 配列番号9の核酸分子に対して少なくとも80%の同一性を有する核酸分子、又は
 (M) ストリンジェントな条件下で配列番号9 (の塩基配列) を有する核酸分子の相補体に
 ハイブリダイズする核酸分子、又は

____ (N) 配列番号10のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

____ (O) 配列番号10のポリペプチドに対して少なくとも60%の相同性を有するポリペプチ
 ドをコードする核酸分子

からなる群より選択される、実施形態19~30のいずれかに記載の組換え微生物。____

[3 2] pta遺伝子が、以下の核酸分子：

____ (P) 配列番号11の (塩基) 配列を含む核酸分子、又は

____ (Q) 配列番号11の核酸分子に対して少なくとも80%の同一性を有する核酸分子、又は

(R) ストリンジェントな条件下で配列番号11 (の塩基配列) を有する核酸分子の相補体に
 ハイブリダイズする核酸分子、又は

____ (S) 配列番号12のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

____ (T) 配列番号12のポリペプチドに対して少なくとも60%の相同性を有するポリペプチ
 ドをコードする核酸分子

からなる群より選択される、実施形態20~31のいずれかに記載の組換え微生物。____

[3 3] ackA遺伝子が、以下の核酸分子：

____ (U) 配列番号120の (塩基) 配列を含む核酸分子、又は

____ (V) 配列番号120の核酸分子に対して少なくとも80%の同一性を有する核酸分子、又は

____ (W) ストリンジェントな条件下で配列番号120 (の塩基配列) を有する核酸分子の相
 補体にハイブリダイズする核酸分子、又は

____ (X) 配列番号121のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

____ (Y) 配列番号121のポリペプチドに対して少なくとも60%の相同性を有するポリペプ
 チドをコードする核酸分子

からなる群より選択される、実施形態21~32のいずれかに記載の組換え微生物。____

[3 4] frdA遺伝子が、以下の核酸分子：

____ (Z) 配列番号13の (塩基) 配列を含む核酸分子、又は

____ (AA) 配列番号13の核酸分子に対して少なくとも80%の同一性を有する核酸分子、又は

____ (BB) ストリンジェントな条件下で配列番号13 (の塩基配列) を有する核酸分子の相補
 体にハイブリダイズする核酸分子、又は

____ (CC) 配列番号14のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

____ (DD) 配列番号14のポリペプチドに対して少なくとも60%の相同性を有するポリペプ
 チドをコードする核酸分子

からなる群より選択される、実施形態22~33のいずれかに記載の組換え微生物。____

[3 5] dadX遺伝子が、以下の核酸分子：

____ (JJ) 配列番号118の (塩基) 配列を含む核酸分子、又は

____ (KK) 配列番号118の核酸分子に対して少なくとも80%の同一性を有する核酸分子、又は

____ (LL) ストリンジェントな条件下で配列番号118 (の塩基配列) を有する核酸分子の相
 補体にハイブリダイズする核酸分子、又は

____ (MM) 配列番号119のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

____ (NN) 配列番号119のポリペプチドに対して少なくとも60%の相同性を有するポリペプ
 チドをコードする核酸分子

からなる群より選択される、実施形態23~34のいずれかに記載の組換え微生物。____

[3 6] ygaW遺伝子が、以下の核酸分子：

____ (OO) 配列番号109の (塩基) 配列を含む核酸分子、又は

____ (PP) 配列番号109の核酸分子に対して少なくとも80%の同一性を有する核酸分子、又は

____ (QQ) ストリンジェントな条件下で配列番号109 (の塩基配列) を有する核酸分子の相
 補体にハイブリダイズする核酸分子、又は

____ (RR) 配列番号110のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

____ (SS) 配列番号110のポリペプチドに対して少なくとも60%の相同性を有するポリペプ

10

20

30

40

50

チドをコードする核酸分子

からなる群より選択される、実施形態24～35のいずれかに記載の組換え微生物。

[37] zipA遺伝子が、以下の核酸分子：

— (TT) 配列番号111の(塩基)配列を含む核酸分子、又は

— (UU) 配列番号111の核酸分子に対して少なくとも80%の同一性を有する核酸分子、又は

— (VV) ストリンジェントな条件下で配列番号111(の塩基配列)を有する核酸分子の相補体にハイブリダイズする核酸分子、又は

— (WW) 配列番号112のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

— (XX) 配列番号112のポリペプチドに対して少なくとも60%の相同性を有するポリペプチドをコードする核酸分子

10

からなる群より選択される、実施形態25～36のいずれかに記載の組換え微生物。

[38] lpd遺伝子が、以下の核酸分子：

— (YY) 配列番号113の(塩基)配列を含む核酸分子、又は

— (ZZ) 配列番号113の核酸分子に対して少なくとも80%の同一性を有する核酸分子、又は

— (AAA) ストリンジェントな条件下で配列番号113(の塩基配列)を有する核酸分子の相補体にハイブリダイズする核酸分子、又は

— (BBB) 配列番号114のポリペプチドをコードする核酸分子、又は

— (CCC) 配列番号114のポリペプチドに対して少なくとも60%の相同性を有するポリペプチドをコードする核酸分子

からなる群より選択される、実施形態26～37のいずれかに記載の組換え微生物。

20

[39] 前記微生物が、コリネバクテリウム属、パチルス属、エルウィニア属、エシェリキア属、パントエア属、ストレプトミセス属、ザイモモナス属、ロドコッカス属及びサッカロミセス属からなる群の属から選択される、実施形態10～34のいずれかに記載の組換え微生物。

[40] 実施形態10～39のいずれかに記載の1種以上の組換え微生物を含む組成物。

[41] 培地及び炭素源をさらに含む、実施形態40に記載の組成物。

[42] 以下のステップ：

— (I) 実施形態1～3のいずれかに規定される核酸分子のうちの少なくとも1つ又は実施形態4～7のいずれかに規定されるアミノ酸分子のうちの少なくとも1つ又は実施形態8に記載の発現構築物又は実施形態9に記載のベクターを、微生物に導入するステップ；及び

— (II) 実施形態1～3のいずれかに規定される核酸分子のうちの少なくとも1つ又は実施形態4～7のいずれかに規定されるアミノ酸分子のうちの少なくとも1つ又は実施形態8に記載の発現構築物又は実施形態9に記載のベクターを含まない対応する微生物と比較して、ピルベート、スクシネート、アスパルテート、マレート、ラクテート、バリン、ロイシン及び/又はアラニンの収量が増強された組換え微生物を生成するステップを含む、ピルベート、スクシネート、アスパルテート、マレート、ラクテート、バリン、ロイシン及び/又はアラニンの収量が増強された組換え微生物の作製方法。

30

[43] 前記方法で用いられる組換え微生物が、実施形態16、24～28及び36～38のいずれかに規定される遺伝子の少なくとも1つの活性及び/又は発現の増大又は増強、並びに/あるいは実施形態17～23及び29～35のいずれかに規定される少なくとも1つの遺伝子の活性及び/又は発現の低減、抑制又は欠失をさらに含む、実施形態42に記載の方法。

40

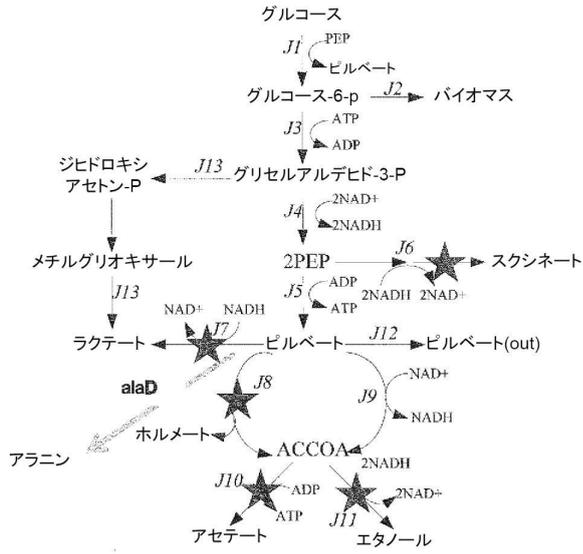
[44] 前記微生物が、コリネバクテリウム属、パチルス属、エルウィニア属、エシェリキア属、パントエア属、ストレプトミセス属、ザイモモナス属、ロドコッカス属及びサッカロミセス属からなる群の属から選択される、実施形態42又は43に記載の方法。

[45] ピルベート、スクシネート、アスパルテート、マレート、ラクテート、バリン、ロイシン及び/又はアラニンの産生を可能にする条件下で、実施形態10～39のいずれかに記載の1種以上の組換え微生物を培養するステップを含む、ピルベート、スクシネート、アスパルテート、マレート、ラクテート、バリン、ロイシン及び/又はアラニンの製造方法。

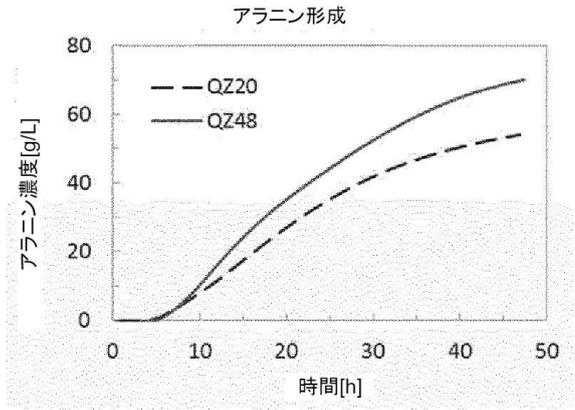
[46] 前記微生物が、0.5%～30%(w/v)の糖を含む培地中で培養される、実施形態45

50

【 図 6 】

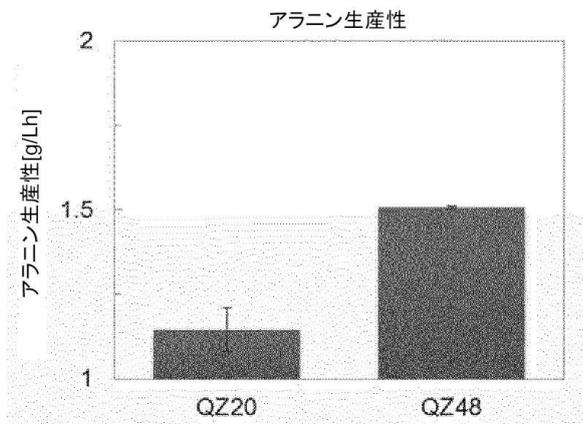


【 図 7 】

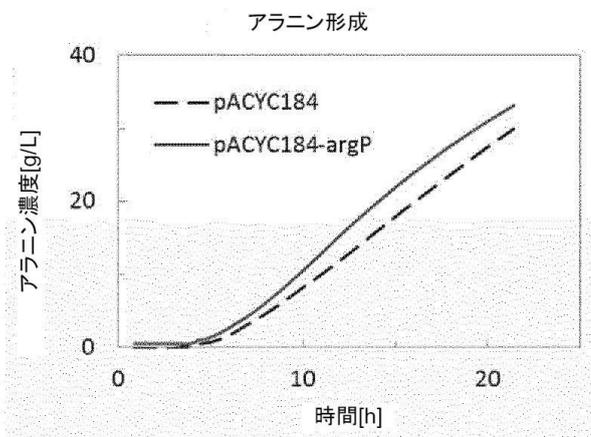


10

【 図 8 】



【 図 9 】



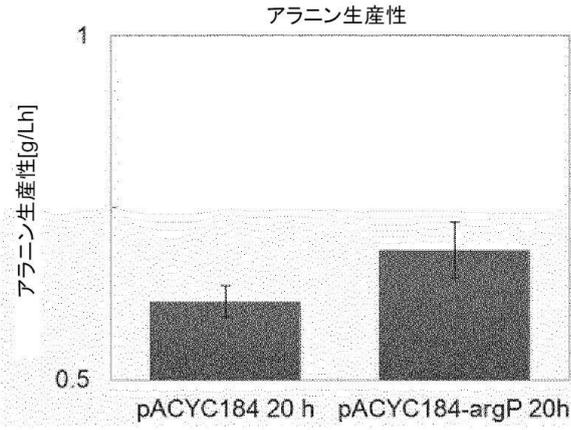
20

30

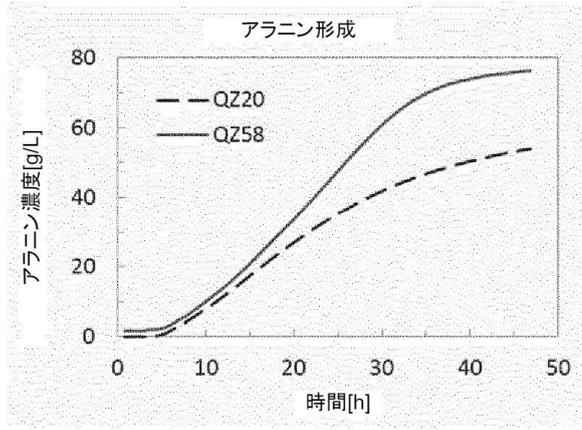
40

50

【図 1 0】

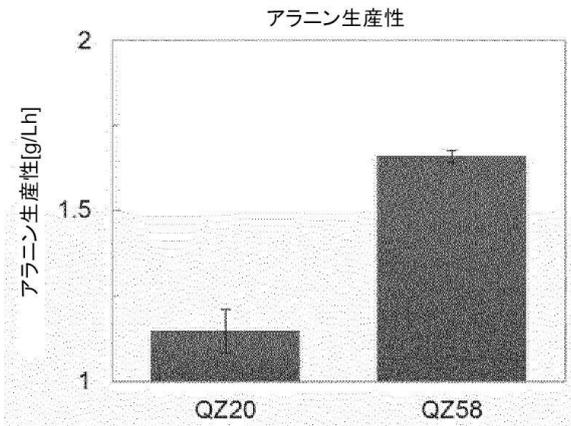


【図 1 1】

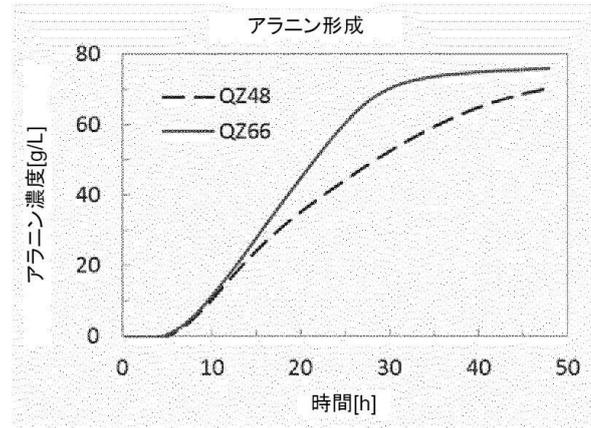


10

【図 1 2】



【図 1 3】



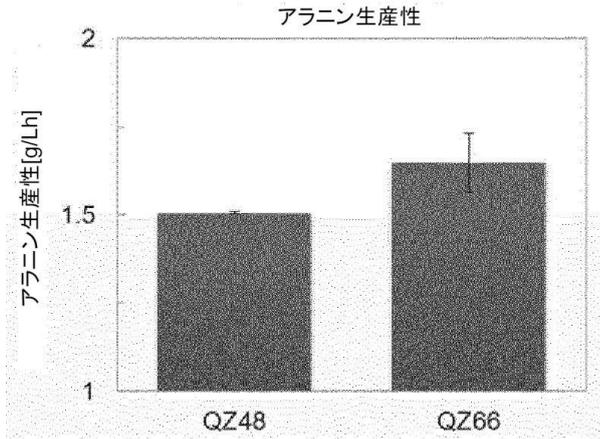
20

30

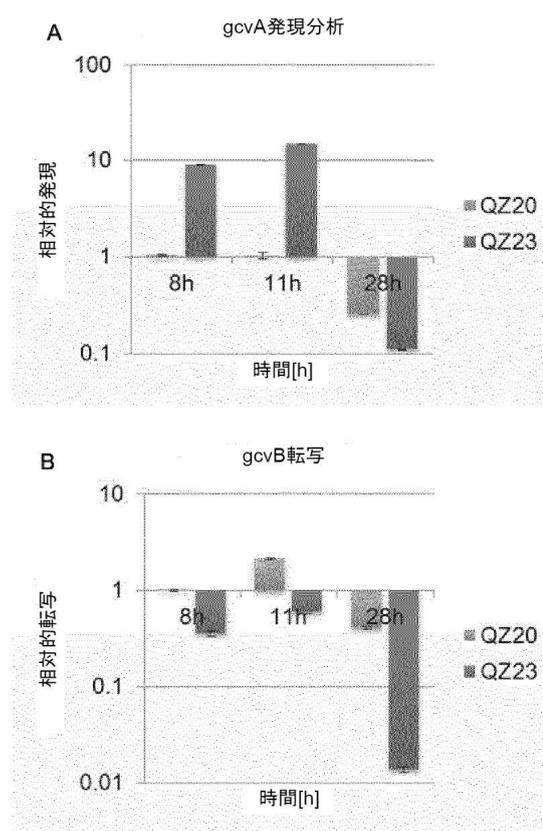
40

50

【 図 1 4 】



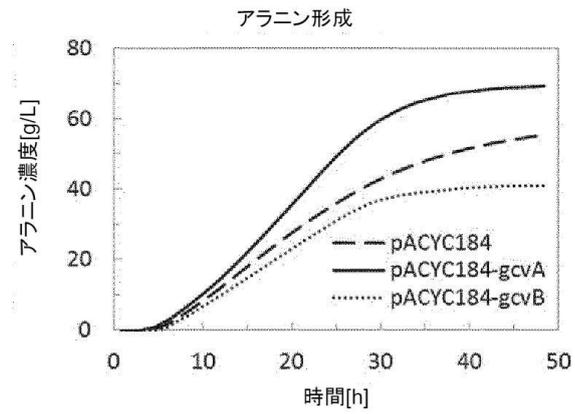
【 図 1 5 】



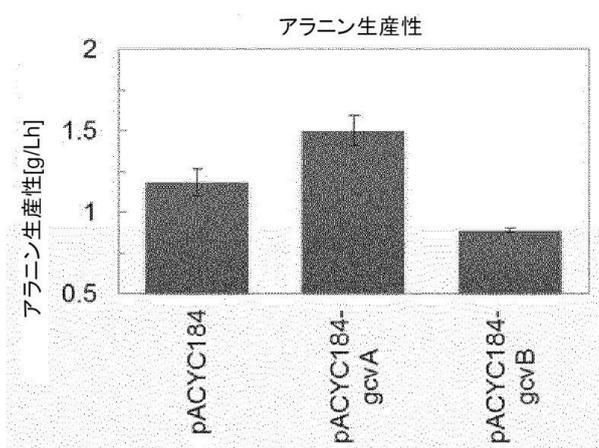
10

20

【 図 1 6 】



【 図 1 7 】

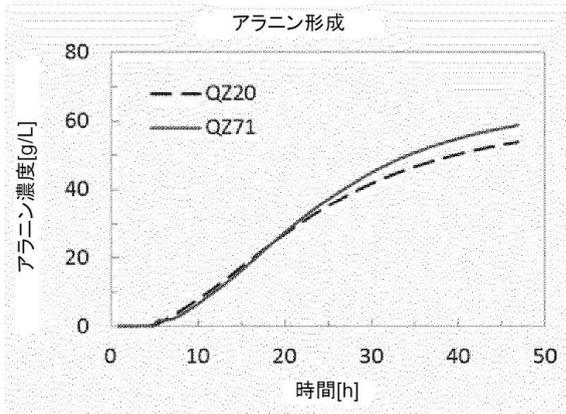


30

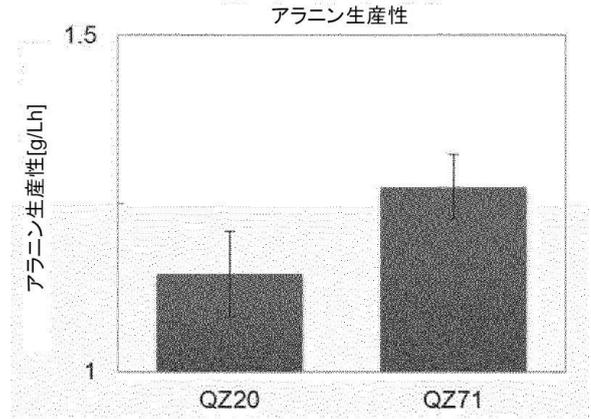
40

50

【図 18】

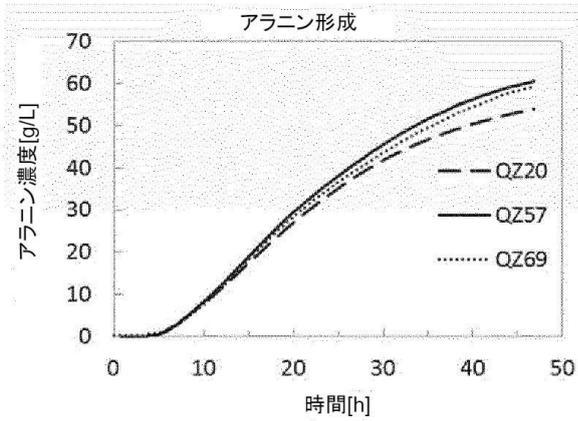


【図 19】

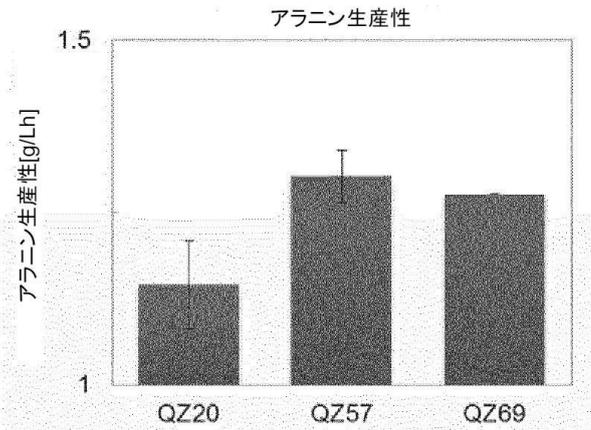


10

【図 20】



【図 21】



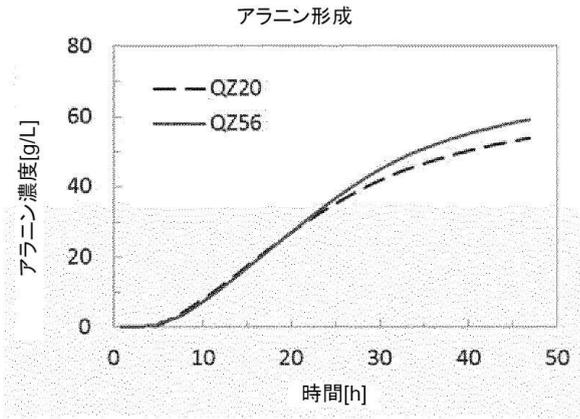
20

30

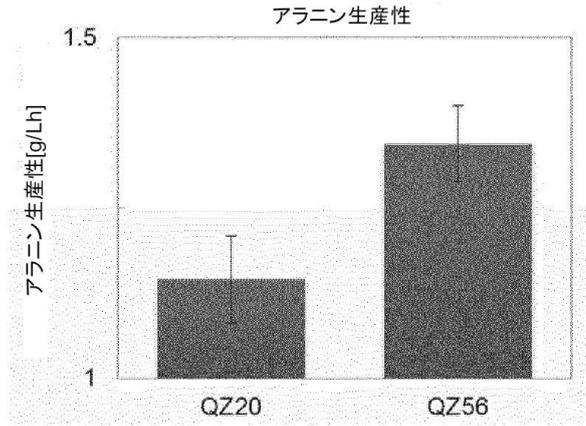
40

50

【 図 2 2 】

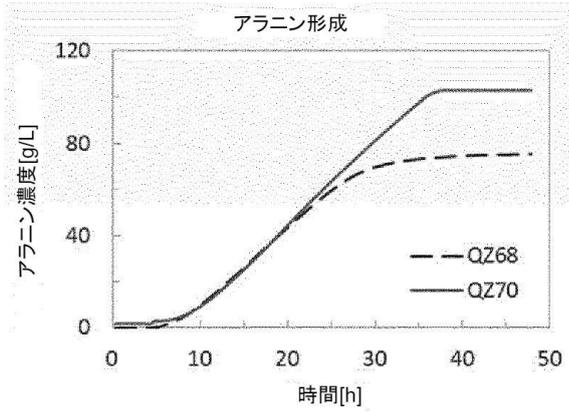


【 図 2 3 】

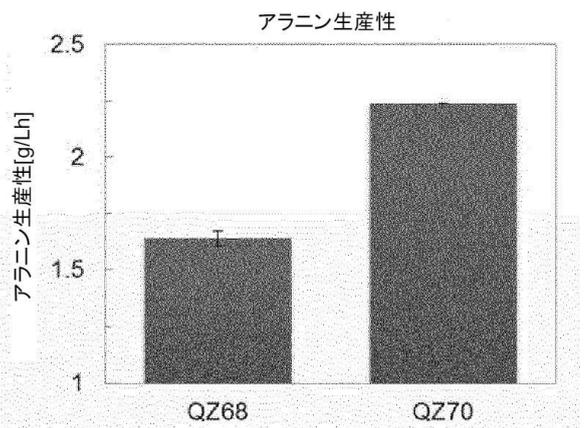


10

【 図 2 4 】



【 図 2 5 】



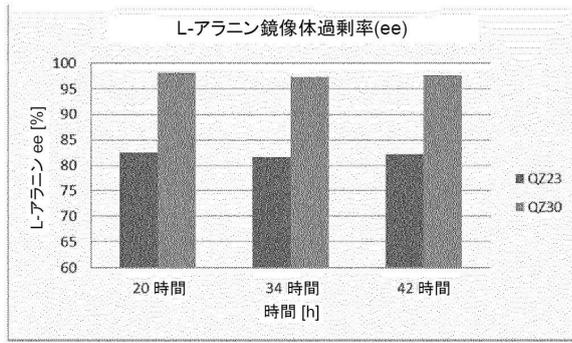
20

30

40

50

【 図 2 6 】



10

【 配列表 】

0007071124000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 P	7/40	(2006.01)	F I	C 1 2 P	7/40	
C 1 2 P	7/46	(2006.01)		C 1 2 P	7/46	
C 1 2 P	13/20	(2006.01)		C 1 2 P	13/20	
C 1 2 P	7/56	(2006.01)		C 1 2 P	7/56	
C 1 2 P	13/08	(2006.01)		C 1 2 P	13/08	D
				C 1 2 P	13/06	B

ライブ 2 3 7

(72)発明者

グオ, ツェユアン

アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 タリータウン, ユニオン アベニュー 1 6 2

(72)発明者

シュレーダー, ハルトヴィヒ

ドイツ連邦共和国 6 9 2 2 6 ヌスロツホ, ベンツシュトラッセ 4

(72)発明者

ハルトマン, ホルガー

ドイツ連邦共和国 6 8 1 6 5 マンハイム, シュトレゼマンシュトラッセ 6

(72)発明者

ボンベユス, マルクス

アメリカ合衆国 9 2 1 3 0 サン ディエゴ, アベニーダ カンタリア 5 2 3 4

審査官

中野 あい

(56)参考文献

特許第 6 6 8 5 9 1 0 (J P , B 2)

特開 2 0 0 5 - 2 5 3 4 5 9 (J P , A)

米国特許出願公開第 2 0 1 0 / 0 2 2 7 3 6 1 (U S , A 1)

国際公開第 2 0 0 7 / 1 1 9 5 7 4 (W O , A 2)

国際公開第 2 0 0 8 / 1 1 9 0 0 9 (W O , A 2)

特表 2 0 1 6 - 5 3 9 6 5 1 (J P , A)

特表 2 0 1 8 - 5 1 6 5 8 7 (J P , A)

Archives of microbiology (1998) vol.169, no.4, p.303-312

J. Mol. Biol. (1999) vol.294, no. 5, p.1087-1095

Mol. Gen. Genet. (1998) vol.259, no.6, p.610-614

J. Bacteriol. (1995) vol.177, no.17, p.4940-4946

Mol. Microbiol (2000) vol.37, no.4, p.856-868

J. Bacteriol. (2009) vol.191, no.1, p.238-248

JOURNAL OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY, 2012年06月26日, VOL :39, NR:10, PAGE(S):1549 - 1556

APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, 2007年11月01日, VOL:77, NR:2, PAGE(S):355 - 366

(58)調査した分野

(Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q / U n i P r o t