

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6564929号
(P6564929)

(45) 発行日 令和1年8月21日(2019.8.21)

(24) 登録日 令和1年8月2日(2019.8.2)

(51) Int.Cl.		F 1	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 P	13/00	(2006.01)	C 1 2 P 13/00
C 1 2 N	15/52	(2006.01)	C 1 2 N 15/52 Z N A Z
C 1 2 R	1/15	(2006.01)	C 1 2 R 1:15

請求項の数 20 (全 42 頁)

(21) 出願番号	特願2018-501816 (P2018-501816)	(73) 特許権者	591178012 公益財団法人地球環境産業技術研究機構 京都府木津川市木津川台9丁目2番地
(86) (22) 出願日	平成29年2月24日 (2017.2.24)	(73) 特許権者	000002141 住友ベークライト株式会社 東京都品川区東品川2丁目5番8号
(86) 国際出願番号	PCT/JP2017/007232	(74) 代理人	110000040 特許業務法人池内アンドパートナーズ
(87) 国際公開番号	W02017/146241	(72) 発明者	乾 将行 京都府木津川市木津川台9丁目2番地 公 益財団法人地球環境産業技術研究機構内
(87) 国際公開日	平成29年8月31日 (2017.8.31)	(72) 発明者	平賀 和三 京都府木津川市木津川台9丁目2番地 公 益財団法人地球環境産業技術研究機構内
審査請求日	平成30年5月24日 (2018.5.24)		
(31) 優先権主張番号	特願2016-36190 (P2016-36190)		
(32) 優先日	平成28年2月26日 (2016.2.26)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国 (JP)		
微生物の受託番号	NPMD NITE BP-02188		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コリネ型細菌形質転換体及びそれを用いる4-アミノ安息香酸又はその塩の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントI活性を持つ酵素をコードする遺伝子が、宿主のコリネ型細菌に導入された、パラアミノ安息香酸生産能を有する形質転換体であって、

前記宿主のコリネ型細菌がコリネバクテリウム属細菌である、形質転換体。

【請求項2】

パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントI活性を持つ酵素をコードする遺伝子がpabBである、請求項1に記載の形質転換体。

【請求項3】

さらに、パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントII活性を持つ酵素をコードする遺伝子が、宿主のコリネ型細菌に導入された、請求項1に記載の形質転換体。

【請求項4】

(i) パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントI活性を持つ酵素をコードする遺伝子pabBとパラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントII活性を持つ酵素をコードする遺伝子pabA、又は(ii)パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントI活性とパラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントII活性を持つ2成分酵素をコードする遺伝子pabABが、宿主のコリネ型細菌に導入された、請求項3に記載の形質転換体。

【請求項5】

さらに、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸リアーゼ活性を持つ酵素をコードする遺伝子

が、宿主のコリネ型細菌に導入された、請求項 1 に記載の形質転換体。

【請求項 6】

(i)パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントI活性を持つ酵素をコードする遺伝子pabBと4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸リアーゼ活性を持つ酵素をコードする遺伝子pabC、又は(ii)パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントI活性と4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸リアーゼ活性を持つ2成分酵素をコードする遺伝子pabBCが、宿主のコリネ型細菌に導入された、請求項 5 に記載の形質転換体。

【請求項 7】

さらに、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸リアーゼ活性を持つ酵素をコードする遺伝子が、宿主のコリネ型細菌に導入された、請求項 3 に記載の形質転換体。

10

【請求項 8】

(i)パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントI活性を持つ酵素をコードする遺伝子pabBとパラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントII活性を持つ酵素をコードする遺伝子pabAと4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸リアーゼ活性を持つ酵素をコードする遺伝子pabC、(ii)パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントI活性と4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸リアーゼ活性を持つ2成分酵素をコードする遺伝子pabBCとパラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントII活性を持つ酵素をコードする遺伝子pabA、(iii)パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントI活性とパラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントII活性を持つ2成分酵素をコードする遺伝子pabABと4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸リアーゼ活性を持つ酵素をコードする遺伝子pabC、又は(iv)パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントI活性とパラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントII活性を持つ2成分酵素をコードする遺伝子pabABとパラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントI活性と4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸リアーゼ活性を持つ2成分酵素をコードする遺伝子pabBCが、宿主のコリネ型細菌に導入された、請求項 7 に記載の形質転換体。

20

【請求項 9】

pabABがコリネバクテリウム属細菌、ニューロスポラ属細菌、又はロドコッカス属細菌の遺伝子である、請求項 4 又は 8 に記載の形質転換体。

【請求項 10】

pabABがコリネバクテリウム カルナエ (*Corynebacterium callunae*)、コリネバクテリウム エフィシエンス (*Corynebacterium efficiens*)、コリネバクテリウム カゼイ (*Corynebacterium casei*)、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 ウレイセレリボランス (*Corynebacterium ureicelerivorans*)、コリネバクテリウム アルジェントラテンス (*Corynebacterium argenteratense*)、コリネバクテリウム テルペノタビダム (*Corynebacterium terpenotabidum*)、ニューロスポラ クラサ (*Neurospora crassa*)、ロドコッカス オパクス (*Rhodococcus opacus*)、又はロドコッカス オパクス (*Rhodococcus erythropolis*) の遺伝子である、請求項 9 に記載の形質転換体。

30

【請求項 11】

pabCが、エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*)、エシェリヒア フェルグソニ (*Escherichia fergusonii*)、サッカロファガス デグラダンス (*Saccharophagus degradans*)、シェワネラ ウッディ (*Shewanella woodyi*)、アースロバクター フェナンスレニボランス (*Arthrobacter phenanthrenivorans*)、アナバエナ バリアビリス (*Anabaena variabilis*)、アゾトバクター ビネランディ (*Azotobacter vinelandii*)、オクロバクトラム アンソロピ (*Ochrobactrum anthropi*)、クロストリジウム ベイジェリンキ (*Clostridium beijerinckii*)、キセノルハブダス ボビエニ (*Xenorhabdus bovienii*)、バチルス シュードフィルムス (*Bacillus pseudofirmus*)、カウロバクター クレセントス (*Caulobacter crescentus*)、シネココッカス種 (*Synechococcus* sp.)、バクテロイデス スライオタオミクロン (*Bacteroides thraiotaomicron*)、又はフェリモナス バレアリカ (*Ferimonas balearica*) 由来の遺伝子である、請求項 6 又は 8 に記載の形質転換体。

40

50

【請求項 1 2】

pabBCが、ラルストニア属、カプリアビダス属、又はクロモハロバクター属細菌の遺伝子である、請求項 6 又は 8 に記載の形質転換体。

【請求項 1 3】

pabBCが、ラストニア ユートロファ (*Ralstonia eutropha*)、カプリアビダス タイワンシス (*Cupriavidus taiwanensis*)、又はクロモハロバクター サレキシゲネス (*Chromohalobacter salexigens*) の遺伝子である、請求項 1 2 に記載の形質転換体。

【請求項 1 4】

pabAがエンテロバクター属細菌の遺伝子である、請求項 4 又は 8 に記載の形質転換体。

【請求項 1 5】

pabAがエンテロバクター クロアカエ (*Enterobacter cloacae*) の遺伝子である、請求項 1 4 に記載の形質転換体。

【請求項 1 6】

前記コリネバクテリウム属細菌がコリネバクテリウム グルタミカムである請求項 1 から 1 5 のいずれかに記載の形質転換体。

【請求項 1 7】

宿主のコリネバクテリウム グルタミカムが、コリネバクテリウム グルタミカムR (FERM BP-18976)、ATCC13032、又はATCC 13869である請求項 1 6 に記載の形質転換体。

【請求項 1 8】

コリネバクテリウム グルタミカム形質転換体ANI198 (NITE BP-02188)。

【請求項 1 9】

請求項 1 ~ 1 8 のいずれかに記載の形質転換体を、糖類を含む反応液中で培養して4-アミノ安息香酸又はその塩を生産させる工程を含む4-アミノ安息香酸又はその塩の製造方法。

【請求項 2 0】

好氣的、かつ形質転換体が増殖しない条件下で形質転換体を培養する請求項 1 9 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、4-アミノ安息香酸（パラアミノ安息香酸とも言う。以下、「4-ABA」と略称することがある）又はその塩の生産能を付与するために特定の遺伝子操作が施されたコリネ型細菌の形質転換体、及びこの形質転換体を用いた効率的な4-ABAの製造方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

地球温暖化、および化石資源の枯渇問題を背景に、再生可能な資源を原料とした化学品の製造は、バイオ燃料と並んで新産業バイオリファイナリーとして低炭素社会実現に向けた重要な方策であることが認識され、注目されている。

【0 0 0 3】

4-ABAは分子内にアミノ基とカルボキシル基を持ち、ポリマー原料としての需要が見込まれている。また、紫外線吸収剤や医薬品の原料として既に広く用いられている。

従来、4-ABAは石油を原料に多段階の反応を経て合成されてきた。すなわち、石油由来のトルエンからパラニトロトルエンを合成し、パラニトロ安息香酸またはパラトルイジンを経て4-ABAを合成する経路である。これらの反応では強酸や高温条件が求められるため、多大なエネルギーを必要とする。従って、脱化石資源依存および二酸化炭素排出削減の観点から、環境調和型プロセスであるバイオリファイナリー技術を用いた4-ABA生産法が強く望まれている。

【0 0 0 4】

一方、多くの微生物が、葉酸の前駆体として4-ABAの生産経路を有している。すなわち

10

20

30

40

50

、細菌、酵母、植物等が有する芳香族化合物合成経路いわゆるシキミ酸経路を通してコリスミ酸を生成した後、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸を経て4-ABAを合成する経路である。

コリスミ酸から4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸への変換は、実際には2段階反応によって行われる。パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントII (PabA) がグルタミンからアンモニア基を遊離させ、パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントI (PabB) がそのアンモニア基とコリスミ酸から4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸を合成する。さらに、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸は4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸リアーゼ (PabC) によって4-ABAに変換される。大腸菌はpabA遺伝子、pabB遺伝子、pabC遺伝子を染色体上でそれぞれ別の位置に持っているが、2成分タンパク質としてpabABを持つ微生物やpabB Cを持つ微生物も存在する。

【0005】

ここで、非特許文献1は、酵母にabz1遺伝子(pabABの相同遺伝子)を過剰発現させた形質転換体を用いて4-ABAを生産することを教えている。しかし、この形質転換体の4-ABA生産性は160時間で250 μMと極端に低く、実用的ではない。

また、特許文献1及び非特許文献2は、コリネバクテリウム エフィシエンス由来のpabABを大腸菌の染色体に導入した形質転換体を用いて4-ABAを生産することを報告している。しかし、4-ABA生産性は48時間で35 mM (4.8 g/L) と低く、工業的生産には不十分である。また、特許文献1は、サッカロポリスポラ エリスレア由来のpabABをストレプトマイセス リビダンスに導入した形質転換体を用いて4-ABAを生産することも報告しているが、4-ABA生産性は9日間で1 mM以下であった。

また、特許文献2は、サッカロマイセス セレピシエ、クルイペロマイセス ラクティス、アスペルギルス ニガー、シネコスチス、又は大腸菌において、pabA、pabB、及びpabCを過剰発現させ得ること、それによりコリスミ酸から4-ABAの変換を増大させ得ることを記載している。しかし、特許文献2は、4-ABAの生産可能性を記載しているだけで、4-ABAを生産した実例は記載していない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特開2015-15号公報

【特許文献2】米国2014/0371418A1号公報

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】J Biotechnol (2013) 163:184-193

【非特許文献2】Biosci Biotechnol Biochem; 2014, Vol.78, No.2, 350-357

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、糖類を原料として、効率よく4-ABA又はその塩を製造できる微生物、及び、この微生物を用いて効率良く4-ABA又はその塩を製造する方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

上記課題を解決するために本発明者らは研究を重ね、以下の知見を得た。

(i) これまでに4-ABAの生産が報告されている幾つかの形質転換体の宿主について、それらの増殖に及ぼす4-ABAの影響を比較したところ、コリネバクテリウム グルタミカム、エシェリヒア コリ、ストレプトマイセス リビダンス、シュードモナスプチダ、サッカロマイセス セレピシエの中では、コリネバクテリウム グルタミカムが最も4-ABA耐性が高い。具体的には、コリネバクテリウム グルタミカムは、数百mMオーダーの高濃度の4-ABAの存在下でも増殖でき、また、4-ABAが存在しない場合と同程度に糖を消費できる。このよ

うに、コリネバクテリウム グルタミカムは、4-ABA耐性が非常に強いため、4-ABA又はその塩の生産に適する。

(ii) コリネ型細菌に、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸リアーゼをコードする遺伝子(pabC)、パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントIをコードする遺伝子(pabB)、及びパラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントIIをコードする遺伝子(pabA)を導入した形質転換体は、効率よく糖類から4-ABA又はその塩を生産できる。

(iii) コリネ型細菌に、パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントIをコードする遺伝子(pabB)を導入した形質転換体は、アンモニア又はアンモニウム塩を含有する培地中で、効率よく糖類から4-ABA又はその塩を生産できる。

(iv) これらの形質転換体は、好氣的、かつ実質的に増殖しない条件下で反応させる場合に、特に4-ABAの生産効率が高い。

10

【 0 0 1 0 】

本発明は上記知見に基づき完成されたものであり、以下の形質転換体、及び、4-ABA又はその塩の製造方法を提供する。

項1. パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントI活性を持つ酵素をコードする遺伝子が、宿主のコリネ型細菌に導入された、パラアミノ安息香酸生産能を有する形質転換体。

項2. パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントI活性を持つ酵素をコードする遺伝子がpabBである、項1に記載の形質転換体。

項3. さらに、パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントII活性を持つ酵素をコードする遺伝子が、宿主のコリネ型細菌に導入された、項1に記載の形質転換体。

20

項4. (i) パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントI活性を持つ酵素をコードする遺伝子pabBとパラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントII活性を持つ酵素をコードする遺伝子pabA、又は(ii)パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントI活性とパラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントII活性を持つ2成分酵素をコードする遺伝子pabABが、宿主のコリネ型細菌に導入された、項3に記載の形質転換体。

項5. さらに、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸リアーゼ活性を持つ酵素をコードする遺伝子が、宿主のコリネ型細菌に導入された、項1に記載の形質転換体。

項6. (i)パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントI活性を持つ酵素をコードする遺伝子pabBと4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸リアーゼ活性を持つ酵素をコードする遺伝子pabC、又は(ii)パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントI活性と4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸リアーゼ活性を持つ2成分酵素をコードする遺伝子pabBCが、宿主のコリネ型細菌に導入された、項5に記載の形質転換体。

30

項7. さらに、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸リアーゼ活性を持つ酵素をコードする遺伝子が、宿主のコリネ型細菌に導入された、項3に記載の形質転換体。

項8. (i)パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントI活性を持つ酵素をコードする遺伝子pabBとパラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントII活性を持つ酵素をコードする遺伝子pabAと4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸リアーゼ活性を持つ酵素をコードする遺伝子pabC、(ii)パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントI活性と4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸リアーゼ活性を持つ2成分酵素をコードする遺伝子pabBCとパラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントII活性を持つ酵素をコードする遺伝子pabA、(iii)パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントI活性とパラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントII活性を持つ2成分酵素をコードする遺伝子pabABと4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸リアーゼ活性を持つ酵素をコードする遺伝子pabC、又は(iv)パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントI活性とパラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントII活性を持つ2成分酵素をコードする遺伝子pabABとパラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントI活性と4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸リアーゼ活性を持つ2成分酵素をコードする遺伝子pabBCが、宿主のコリネ型細菌に導入された、項7に記載の形質転換体。

40

項9. pabABがコリネバクテリウム属細菌、ニューロスポラ属細菌、又はロドコッカス属

50

細菌の遺伝子である、請求項 4 又は 8 に記載の形質転換体。

項 10 . *pabAB*がコリネバクテリウム カルナエ (*Conynebacterium callunae*)、コリネバクテリウム エフィシエンス (*Conynebacterium efficiens*)、コリネバクテリウム カゼイ (*Conynebacterium casei*)、コリネバクテリウム グルタミカム (*Conynebacterium glutamicum*)、コリネバクテリウム ウレイセレリボランス (*Conynebacterium ureicelerivorans*)、コリネバクテリウム アルジェントラテンシ (*Conynebacterium argentoratense*)、コリネバクテリウム テルペノタビダム (*Conynebacterium terpenotabidum*)、ニューロスボラ クラサ (*Neurospora crassa*)、ロドコッカス オパクス (*Rodococcus opacus*)、又はロドコッカス エリスロポリス (*Rodococcus erythropolis*) の遺伝子である、請求項 9 に記載の形質転換体。

10

項 11 . *pabC*が、エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*)、エシェリヒア フェルグソニ (*Escherichia fergusonii*)、サッカロファガス デグラダンス (*Saccharophagus degradans*)、シェワネラ ウッディ (*Shewanella woodyi*)、アースロバクター フェナンスレニボランス (*Arthrobacter phenanthrenivorans*)、アナバエナ バリアピリス (*Anabaena variabilis*)、アゾトバクター ビネランディ (*Azotobacter vinelandii*)、オクロバクトラム アンソロピ (*Ochrobactrum anthropi*)、クロストリジウム ベイジェリンキ (*Clostridium beijerinckii*)、キセノルハブダス ボビエニ (*Xenorhabdus bovienii*)、バチルス シュードフィルムス (*Bacillus pseudofirmus*)、カウロバクター クレセントス (*Caulobacter crescentus*)、シネコッカス種 (*Synechococcus sp.*)、バクテロイデス スライオタオミクロン (*Bacteroides thraiotaoomicron*)、又はフェリモナス バレアリカ (*Ferrimonas balearica*) 由来の遺伝子である、項 6 又は 8 に記載の形質転換体。

20

項 12 . *pabBC*が、ラルストニア属、カプリアビダス属、又はクロモハロバクター属細菌の遺伝子である、項 6 又は 8 に記載の形質転換体。

項 13 . *pabBC*が、ラストニア ユートロファ (*Ralstonia eutropha*)、カプリアビダス タイワネンシス (*Cupriavidus taiwanensis*)、又はクロモハロバクター サレキシゲネス (*Chromohalobacter salexigens*) の遺伝子である、項 12 に記載の形質転換体。

項 14 . *pabA*がエンテロバクター属細菌の遺伝子である、項 4 又は 8 に記載の形質転換体。

項 15 . *pabA*がエンテロバクター クロアカエ (*Enterobacter cloacae*) の遺伝子である、項 14 に記載の形質転換体。

30

項 16 . 宿主のコリネ型細菌がコリネバクテリウム属細菌である項 1 ~ 15 の何れかに記載の形質転換体。

項 17 . 宿主のコリネバクテリウム属細菌がコリネバクテリウム グルタミカムである項 16 に記載の形質転換体。

項 18 . 宿主のコリネバクテリウム グルタミカムが、コリネバクテリウム グルタミカム R (FERM BP-18976)、ATCC13032、又はATCC 13869である項 17 に記載の形質転換体。

項 19 . コリネバクテリウム グルタミカム形質転換体ANI198 (NITE BP-02188)。

項 20 . 項 1 ~ 19 のいずれかに記載の形質転換体を、糖類を含む反応液中で培養して4-アミノ安息香酸又はその塩を生産させる工程を含む4-アミノ安息香酸又はその塩の製造方法。

40

項 21 . 好氣的、かつ形質転換体が増殖しない条件下で形質転換体を培養する項 20 に記載の方法。

【発明の効果】

【0011】

コリネ型細菌に、パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントIをコードする遺伝子、パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントIIをコードする遺伝子、及び4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸リアーゼをコードする遺伝子を導入した形質転換体は、グルコース等の糖類から、高濃度かつ高収率で4-ABAを生産できる。

また、アンモニア又はアンモニウム塩を含有する培養液中で、形質転換体を培養することにより4-ABAを生産する場合は、パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントIIを

50

コードする遺伝子を導入しなくてもよく、コリネ型細菌に、パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントIをコードする遺伝子、又はさらに4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸リアーゼをコードする遺伝子を導入した形質転換体が、グルコース等の糖類から、高濃度かつ高収率で4-ABAを生産できる。

従って、本発明により、ポリマー、医薬品、紫外線吸収剤等の原料として有用な4-ABAを、環境負荷を抑えて、安価かつ大量に生産できるようになった。

【0012】

本発明では、4-ABA又はその塩生産効率の点で、宿主としてコリネ型細菌を用いることが重要である。従って、本発明では、宿主のコリネ型細菌と上記の特定の導入遺伝子との組み合わせが重要と言える。

一般に微生物は4-ABAのような芳香族化合物の細胞毒性により、増殖が阻害されるため、微生物を用いて4-ABAを製造することは困難であった。しかし、コリネ型細菌は、4-ABAに対する耐性が非常に強いため、本発明の形質転換体を用いれば、高濃度の4-ABA又はその塩を生産することができる。また、コリネ型細菌は、大腸菌とは異なりエンドトキシンを生成しないため、生産物へのエンドトキシンの残留を懸念する必要がない。また、コリネ型細菌は、増殖を制限した条件下でも4-ABA又はその塩の生成反応が進むため、原料の糖が増殖のために消費されず4-ABA又はその塩の収率が高くなると共に、微生物の増殖に一般に求められる芳香族アミノ酸、4-ヒドロキシ安息香酸などを培養液に添加する必要がなく、その分、生産コストを抑えることができる。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】パラアミノ安息香酸存在下での、コリネバクテリウム グルタミカムを含む種々の微生物の増殖曲線である。

【図2】パラアミノ安息香酸存在下での、コリネバクテリウム グルタミカム野生株の反応液中グルコース濃度の経時変化を示す図である。

【図3】pabAB及びpabCを導入したコリネバクテリウム グルタミカム形質転換体による、グルコースからのパラアミノ安息香酸生産の経時変化を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0014】

以下、本発明を詳細に説明する。

(1) 4-ABA生産能を有する形質転換体

宿主

本発明では、コリネ型細菌を宿主として使用する。

コリネ型細菌とは、バーヂーズ・マニユアル・デターミネイティブ・バクテリオロジー [Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Vol. 8, 599 (1974)] に定義されている一群の微生物であり、通常の好氣的条件で増殖するものならば特に限定されるものではない。具体例を挙げれば、コリネバクテリウム属菌、プレバクテリウム属菌、アースロバクター属菌、マイコバクテリウム属菌、マイクロコッカス属菌等が挙げられる。コリネ型細菌の中ではコリネバクテリウム属菌が好ましい。

【0015】

コリネバクテリウム属菌としては、コリネバクテリウム グルタミカム、コリネバクテリウム エフィシエンス (*Corynebacterium efficiens*)、コリネバクテリウム アンモニアゲネス (*Corynebacterium ammoniagenes*)、コリネバクテリウム ハロトレランス (*Corynebacterium halotolerance*)、コリネバクテリウム アルカノリティカム (*Corynebacterium alkanolyticum*) 等が挙げられる。

中でも、安全でかつ4-HBA生産性が高い点で、コリネバクテリウム グルタミカムが好ましい。好適な菌株として、コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) R株 (FERM BP-18976)、ATCC13032株、ATCC13869株、ATCC13058株、ATCC13059株、ATCC13060株、ATCC13232株、ATCC13286株、ATCC13287株、ATCC13655株、ATCC13745株、ATCC13746株、ATCC13761株、ATCC14020株、ATCC31831株、MJ-233 (FERM BP-1497)、MJ-233A

10

20

30

40

50

B-41 (FERM BP-1498) 等が挙げられる。これらの株は、ブダペスト条約の下で国際寄託されており、公に利用可能である。

中でも、R株 (FERM BP-18976)、ATCC13032株、ATCC13869株が好ましい。

【0016】

なお、分子生物学的分類により、ブレビバクテリウム フラバム (*Brevibacterium flavum*)、ブレビバクテリウム ラクトファーメンタム (*Brevibacterium lactofermentum*)、ブレビバクテリウム ディバリカタム (*Brevibacterium divaricatum*)、コリネバクテリウム リリウム (*Corynebacterium lilium*) 等のコリネ型細菌もコリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) に菌名が統一されている [Liebl, W. et al., Transfer of *Brevibacterium divaricatum* DSM 20297T, "*Brevibacterium flavum*" DSM 20411, "*Brevibacterium lactofermentum*" DSM 20412 and DSM 1412, and *Corynebacterium glutamicum* and their distinction by rRNA gene restriction patterns. *Int J Syst Bacteriol.* 41:255-260. (1991)、駒形和男ら、コリネフォルム細菌の分類、発酵と工業, 45:944-963 (1987)]。

ブレビバクテリウム属菌としては、ブレビバクテリウム アンモニアゲネス (*Brevibacterium ammoniagenes*) (例えばATCC6872株) 等が挙げられる。

【0017】

アースロバクター属菌としては、アースロバクター グロビフォルミス (*Arthrobacter globiformis*) (例えばATCC8010株、ATCC4336株、ATCC21056株、ATCC31250株、ATCC31738株、ATCC35698株) 等が挙げられる。

マイコバクテリウム属菌としては、マイコバクテリウム ボビス (*Mycobacterium bovis*) (例えばATCC19210株、ATCC27289株) 等が挙げられる。

マイクロコッカス属菌としては、マイクロコッカス フロイデンライヒ (*Micrococcus freudenreichii*) (例えばNo. 239株 (FERM P-13221))、マイクロコッカス ルテウス (*Micrococcus leuteus*) (例えばNo. 240株 (FERM P-13222))、マイクロコッカス ウレアエ (*Micrococcus ureae*) (例えばIAM1010株)、マイクロコッカス ロゼウス (*Micrococcus roseus*) (例えばIF03764株) 等が挙げられる。

以上の株は、ブダペスト条約の下で国際寄託されており、公に利用可能である。

【0018】

また、コリネ型細菌は、野生株の他に、その変異株や人為的な遺伝子組換え体であってもよい。例えば、ラクテート(乳酸)デヒドロゲナーゼ (lactate dehydrogenase: LDH)、フォスフォエノールピルベートカルボキシラーゼ (phosphoenolpyruvate carboxylase)、マレートデヒドロゲナーゼ (malate dehydrogenase) などの遺伝子の破壊株が挙げられる。中でも、ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子の破壊株が好ましい。この遺伝子破壊株は、乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子が破壊されていることにより、ピルビン酸から乳酸への代謝経路が遮断されている。中でも、コリネバクテリウム グルタミカムの、特にR (FERM BP-18976) 株のラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子の破壊株が好ましい。

このような遺伝子破壊株は、遺伝子工学的手法により常法に従い作製できる。例えば、WO2005/010182A1に、乳酸デヒドロゲナーゼ破壊株、及びその作製方法が記載されている。

【0019】

図2に示した通り、本発明者らは、コリネ型細菌が、他細菌に比べて、4-ABAに対する耐性が極めて高いことを見出した。この点で、コリネ型細菌は本発明方法による4-ABA製造に好適である。

【0020】

導入遺伝子

本発明の1実施態様では、コリネ型細菌に、パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントI活性を持つ酵素をコードする遺伝子と、パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントII活性を持つ酵素をコードする遺伝子と、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸リアーゼ活性を持つ酵素をコードする遺伝子とを導入する。

パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントIは、コリスミ酸とアンモニアから4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸を生成する反応を触媒する。また、パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントIIは、グルタミンからグルタミン酸とアンモニアを生じる反応を触媒する。また、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸リアーゼは、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸から4-アミノ安息香酸（4-ABA又はその塩）とピルビン酸を生成する反応を触媒する。

従って、上記3遺伝子をコリネ型細菌に導入することにより、コリスミ酸から4-ABA又はその塩の生成を効率よく行える形質転換体となる。

【0021】

但し、反応液ないしは培養液中にアンモニア又はアンモニウム塩が含まれる場合は、パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントII活性を有する酵素をコードする遺伝子を導入しなくても良い。その場合、パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントIは、反応液ないしは培養液中のアンモニア又はアンモニウム塩を利用して、コリスミ酸から4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸を生成する。

また、コリネ型細菌は、染色体上に4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸リアーゼ遺伝子を有するため、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸リアーゼ活性を有する酵素をコードする遺伝子は、必ずしも導入しなくても良い。しかし、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸リアーゼ活性を有する酵素をコードする遺伝子を導入する方が、4-ABA又はその塩をより効率よく生産できる形質転換体となる。

従って、本発明の他の実施態様の形質転換体は、コリネ型細菌に、パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントI活性を有する酵素をコードする遺伝子を導入したものである。また、パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントI活性を有する酵素をコードする遺伝子に加えて、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸リアーゼ活性を有する酵素をコードする遺伝子を導入することもできる。また、パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントI活性を有する酵素をコードする遺伝子に加えて、パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントII活性を有する酵素をコードする遺伝子を導入することもできる。

【0022】

パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントI活性を有する酵素をコードする遺伝子としてはpabBが挙げられ、パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントII活性を有する酵素をコードする遺伝子としてはpabAが挙げられ、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸リアーゼ活性を有する酵素をコードする遺伝子としてはpabCが挙げられる。

パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントI、パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントII、及び4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸リアーゼのうち2つの活性を有する2成分酵素ないしは2機能酵素も存在する。2成分酵素としては、パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントI活性とパラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントI活性を有する2成分酵素（PabAB）、パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントI活性と4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸リアーゼ活性を有する2成分酵素（PabBC）が挙げられる。

【0023】

従って、コリネ型細菌に導入する遺伝子又は遺伝子の組み合わせとしては、以下のものが挙げられる。

- (i) pabB
- (ii) pabBとpabC
- (iii) pabBC
- (iv) pabBとpabA
- (v) pabAB
- (vi) pabBとpabAとpabC
- (vii) pabABとpabC
- (viii) pabAとpabBC
- (ix) pabABとpabBC

10

20

30

40

50

【 0 0 2 4 】

各遺伝子の由来は特に限定されないが、例えば、下記の微生物の遺伝子が挙げられる。
 pabBとしては、コリネバクテリウム属細菌（特に、コリネバクテリウム クロッペンステディ (*Corynebacterium kroppenstedtii*)、コリネバクテリウム レジステンス (*Corynebacterium resistens*)、コリネバクテリウム ファルセニ (*Corynebacterium falsenii*)）、バチルス属細菌（特に、バチルス サブチリス (*Bacillus subtilis*)、バチルス アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*)、バチルス チューリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*)）、エシェリヒア属細菌（特に、エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*)、エシェリヒア フェルグソニ (*Escherichia fergusonii*)）、ストレプトマイセス属細菌（特に、ストレプトマイセス セリカラー (*Streptomyces coelicolor*)、ストレプトマイセス グリセウス (*Streptomyces griseus*)、ストレプトマイセス リビダンス (*Streptomyces lividans*)）、サルモネラ属細菌（特に、サルモネラ エンテリカ (*Salmonella enterica*)、サルモネラ ボンゴリ (*Salmonella bongori*)）、シュードモナス属細菌（特に、シュードモナス アエルギノサ (*Pseudomonas aeruginosa*)、シュードモナス プチダ (*Pseudomonas putida*)、シュードモナス フルオレセンス (*Pseudomonas fluorescens*)）、エルシニア属細菌（特に、エルシニア ペスチス (*Yersinia pestis*)、エルシニア シュードツベルキュロシス (*Yersinia pseudotuberculosis*)）、エンテロバクター属細菌（特に、エンテロバクター種 (*Enterobacter sp.*)、エンテロバクター クロアカエ (*Enterobacter cloacae*)）、マイコバクテリウム スメグマチス (*Mycobacterium smegmatis*)、クレブシラ ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*)、キセノハブダス ボビエニ (*Xenorhabdus bovienii*)、パントエア アナナチス (*Pantoea ananatis*)、プロビデンシア スチュアーティ (*Providencia stuartii*)、アゾトバクター ビネランディ (*Azotobacter vinelandii*)、アシネトバクター バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*)、シェワネラ ウッディ (*Shewanella woodyi*)、ザイモモナス モビリス (*Zymomonas mobilis*)、クロストリジウム ペルFRINGENS (*Clostridium perfringens*)、又はサッカロポリスポラ エリスレア (*Saccharopolyspora erythraea*)の遺伝子が挙げられる。

中でも、バチルス サブチリス、エシェリヒア コリ、ストレプトマイセス セリカラー、エンテロバクター クロアカエ、マイコバクテリウム スメグマチス、クレブシラ ニューモニエ、キセノハブダス ボビエニ、パントエア アナナチス、プロビデンシア スチュアーティの遺伝子が好ましく、エシェリヒア コリ、エンテロバクター クロアカエ、パントエア アナナチス、プロビデンシア スチュアーティの遺伝子がより好ましい。

【 0 0 2 5 】

コリネバクテリウム クロッペンステディ、コリネバクテリウム レジステンス、コリネバクテリウム ファルセニ、バチルス サブチリス、バチルス アミロリケファシエンス、バチルス チューリングエンシス、エシェリヒア コリ、エシェリヒア フェルグソニ、ストレプトマイセス セリカラー、ストレプトマイセス グリセウス、ストレプトマイセス リビダンス、サルモネラ エンテリカ、サルモネラ ボンゴリ、シュードモナス アエルギノサ、シュードモナス プチダ、シュードモナス フルオレセンス、エルシニア ペスチス、エルシニア シュードツベルキュロシス、エンテロバクター種、エンテロバクター クロアカエ、マイコバクテリウム スメグマチス、クレブシラ ニューモニエ、キセノハブダス ボビエニ、パントエア アナナチス、プロビデンシア スチュアーティ、アゾトバクター ビネランディ、アシネトバクター バウマンニ、シェワネラ ウッディ、ザイモモナス モビリス、クロストリジウム ペルFRINGENS、サッカロポリスポラ エリスレアのpabBとしては、配列番号1、配列番号132、配列番号133、配列番号134、配列番号135、配列番号136、配列番号137、配列番号138、配列番号139、配列番号140、配列番号141、配列番号142、配列番号143、配列番号144、配列番号145、配列番号146、配列番号147、配列番号148、配列番号149、配列番号150、配列番号151、配列番号152、配列番号153、配列番号154、配列番号155、配列番号156、配列番号157、配列番号158、配列番号159、配列番号160、及び配列番号161に示す塩基配列からなるものが挙げられる。

【 0 0 2 6 】

pabCとしては、エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*)、エシェリヒア フェルグソニ (*Escherichia fergusonii*)、サッカロファガス デグラダンス (*Saccharophagus degradans*)、シェワネラ ウッディ (*Shewanella woodyi*)、アースロバクター フェナンスレニボランス (*Arthrobacter phenanthrenivorans*)、アナバエナ バリアピリス (*Anabaena variabilis*)、アゾトバクター ビネランディ (*Azotobacter vinelandii*)、オクロバクトラム アンソロピ (*Ochrobactrum anthropi*)、クロストリジウム ベイジェリンキ (*Clostridium beijerinckii*)、キセノルハブダス ボビエニ (*Xenorhabdus bovienii*)、パチルス シュードフィルムス (*Bacillus pseudofirmus*)、カウロバクター クレセンタス (*Caulobacter crescentus*)、シネコッカス種 (*Synechococcus* sp.)、バクテロイデス スライオタオミクロン (*Bacteroides thetaiotaomicron*)、又はフェリモナス バレアリカ (*Ferrimonas balearica*) の遺伝子が挙げられる。中でも、キセノルハブダス ボビエニ、アナバエナ バリアピリス、パチルス シュードフィルムス、エシェリヒア コリ、オクロバクトラム アンソロピの遺伝子が好ましく、キセノルハブダス ボビエニ、アナバエナ バリアピリス、エシェリヒア コリの遺伝子がより好ましい。

【0027】

エシェリヒア コリ、エシェリヒア フェルグソニ、サッカロファガス デグラダンス、シェワネラ ウッディ、アースロバクター フェナンスレニボランス、アナバエナ バリアピリス、アゾトバクター ビネランディ、オクロバクトラム アンソロピ、クロストリジウム ベイジェリンキ、キセノルハブダス ボビエニ、パチルス シュードフィルムス、カウロバクター クレセンタス、シネコッカス種、バクテロイデス スライオタオミクロン、及びフェリモナス バレアリカのpabCとしては、それぞれ、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、及び配列番号16に示す塩基配列からなるものが挙げられる。

【0028】

pabAとしては、エシェリヒア属細菌(特に、エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*)、エシェリヒア フェルグソニ (*Escherichia fergusonii*))、サルモネラ属細菌(特に、サルモネラ エンテリカ (*Salmonella enterica*)、サルモネラ ボンゴリ (*Salmonella bongori*))、エルシニア属細菌(特に、エルシニア ペスチス (*Yersinia pestis*)、エルシニア シュードツベルキュロシス (*Yersinia pseudotuberculosis*))、エンテロバクター属細菌(特に、エンテロバクター クロアカエ (*Enterobacter cloacae*))、クレブシラ属細菌(特に、クレブシラ ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*))、キセノルハブダス属細菌(特に、キセノルハブダス ボビエニ (*Xenorhabdus bovienii*))、プロビデンシア属細菌(特に、プロビデンシア スチュアーティ (*Providencia stuartii*))、シェワネラ属細菌(特に、シェワネラ ウッディ (*Shewanella woodyi*))、ザイモモナス属細菌(特に、ザイモモナス モビリス (*Zymomonas mobilis*))、パチルス属細菌(特に、パチルス サブチリス (*Bacillus subtilis*))、パチルス チューリンゲンシス (*Bacillus thuringiensis*))、ラクトコッカス属細菌(特に、ラクトコッカス ラクティス (*Lactococcus lactis*))、マイコバクテリウム属細菌(特に、マイコバクテリウム ボビス (*Mycobacterium bovis*)、マイコバクテリウム スメグマチス (*Mycobacterium smegmatis*))、コリネバクテリウム属細菌(特に、コリネバクテリウム ウレアリティカム (*Corynebacterium urealyticum*)、コリネバクテリウム クロップステンステディ (*Corynebacterium kroppenstedtii*)、コリネバクテリウム レジスタンス (*Corynebacterium resistens*)、コリネバクテリウム バリアピレ (*Corynebacterium variabile*)、コリネバクテリウム ファルセニ (*Corynebacterium falsenii*))、ロドコッカス属細菌(特に、ロドコッカス ジョステイ (*Rhodococcus jostii*)、ロドコッカス エリスロポリス (*Rhodococcus erythropolis*)、ロドコッカス オパクス (*Rhodococcus opacus*))、ストレプトマイセス属細菌(特に、ストレプトマイセス セリカラー (*Streptomyces coelicolor*)、ストレプトマイセス アヴェルミティリス (*Streptomyces avermitilis*)、ストレプトマイセス グリセウス (*Streptomyces griseus*)、ストレプトマイセス リビダンス (*Streptomyces lividans*))、アースロバクター属細菌(特に、アースロバクター フェナンスレニ

ボランズ (*Arthrobacter phenanthrenivorans*)), レニバクテリウム属細菌(特に、レニバクテリウム サルモニナルム (*Renibacterium salmoninarum*)), ビフィドバクテリウム属細菌(特に、ビフィドバクテリウム ロングス (*Bifidobacterium longum*)), ビフィドバクテリウム アニマリス (*Bifidobacterium animalis*), ビフィドバクテリウム ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*)), シネココッカス種 (*Synechococcus* sp.), 又はパントエア属細菌(特に、パントエア アナナチス (*Pantoea ananatis*))の遺伝子が挙げられる。中でも、エシェリヒア コリ、プロビデンシア スチュアーティ、エンテロバクター クロアカエ、パントエア アナナチスの遺伝子が好ましく、エンテロバクター クロアカエ、エシェリヒア コリの遺伝子がより好ましい。

【 0 0 2 9 】

エシェリヒア コリ、エシェリヒア フェルグソニ、サルモネラ エンテリカ、サルモネラ ボンゴリ、エルシニア ベスチス、エルシニア シュードツベルキュロシス、エンテロバクター クロアカエ、クレブシラ ニューモニエ、キセノハブダス ボビエニ、プロビデンシア スチュアーティ、シェワネラ ウッディ、ザイモモナス モビリス、バチルス サブチリス、バチルス チューリングゲンシス、ラクトコッカス ラクティス、マイコバクテリウム ボビス、マイコバクテリウム スメグマチス、コリネバクテリウム ウレアリティカム、コリネバクテリウム クロップেনステディ、コリネバクテリウム レジスタンス、コリネバクテリウム バリアビレ、コリネバクテリウム ファルセニ、ロドコッカス ジョステイ、ロドコッカス エリスロポリス、ロドコッカス オパクス、ストレプトマイセス セリカラ、ストレプトマイセス アヴェルミティリス、ストレプトマイセス グリセウス、ストレプトマイセス リピダンス、アースロバクター フェナンスレニボランズ、レニバクテリウム サルモニナルム、ビフィドバクテリウム ロングス、ビフィドバクテリウム アニマリス、ビフィドバクテリウム ビフィダム、シネココッカス種、及びパントエア アナナチスのpabAとしては、配列番号168、配列番号169、配列番号170、配列番号171、配列番号172、配列番号173、配列番号174、配列番号175、配列番号176、配列番号177、配列番号178、配列番号179、配列番号180、配列番号181、配列番号182、配列番号183、配列番号184、配列番号185、配列番号186、配列番号187、配列番号188、配列番号189、配列番号190、配列番号191、配列番号192、配列番号193、配列番号194、配列番号195、配列番号196、配列番号197、配列番号198、配列番号199、配列番号200、配列番号201、及び配列番号202に示す塩基配列からなるものが挙げられる。

【 0 0 3 0 】

pabBCとしては、ラルストニア属(好ましくは、ラルストニア ユートロファ (*Ralstonia eutropha*)), カプリアビダス属(好ましくは、カプリアビダス タイワネンシス (*Cupriavidus taiwanensis*)), クロモハロバクター属(好ましくは、クロモハロバクター サレキシゲネス (*Chromohalobacter salexigens*)), パンドレア属(好ましくは、パンドレア ノメヌサ (*Pandoraea pnomenus*)), ラクトコッカス属(好ましくは、ラクトコッカス ラクティス (*Lactococcus lactis*)), 又はストレプトコッカス属(好ましくは、ストレプトコッカス ニューモニエ (*Streptococcus pneumoniae*)), ストレプトコッカス サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*))の遺伝子が挙げられる。

中でも、ラルストニア ユートロファ、カプリアビダス タイワネンシス、クロモハロバクター サレキシゲネスの遺伝子が好ましく、ラルストニア ユートロファの遺伝子がより好ましい。

【 0 0 3 1 】

ラルストニア ユートロファ、カプリアビダス タイワネンシス、クロモハロバクター サレキシゲネス、パンドレア ノメヌサ、ラクトコッカス ラクティス、ストレプトコッカス ニューモニエ、及びストレプトコッカス サーモフィラスのpabBCとしては、配列番号129、配列番号162、配列番号163、配列番号164、配列番号165、配列番号166、及び配列番号167に示す塩基配列からなるものが挙げられる。

【 0 0 3 2 】

pabABとしては、コリネバクテリウム属細菌(特に、コリネバクテリウム カルナエ (*Co*

10

20

30

40

50

nynebacterium callunae)、コリネバクテリウム エフィシエンズ (Conynebacterium efficiens)、コリネバクテリウム カゼイ (Conynebacterium casei)、コリネバクテリウム グルタミカム (Conynebacterium glutamicum)、コリネバクテリウム ウレイセレリボランス (Conynebacterium ureicelerivorans)、コリネバクテリウム アルジェントラテンズ (Conynebacterium argentoratense)、コリネバクテリウム テルペノタバダム (Conynebacterium terpenotabidum)、ニューロスポラ属細菌 (特に、ニューロスポラ クラサ (Neurospora crassa))、又はロドコッカス属細菌 (特に、ロドコッカス オパクス (Rodococcus opacus)、又はロドコッカス エリスロポリス (Rodococcus erythropolis)) の遺伝子が挙げられる。

中でも、コリネバクテリウム カルナエ、コリネバクテリウム エフィシエンズ、コリネバクテリウム カゼイ、コリネバクテリウム グルタミカム、ロドコッカス オパクス、ニューロスポラ クラサの遺伝子が好ましく、コリネバクテリウム カルナエ、コリネバクテリウム エフィシエンズの遺伝子がより好ましい。

【 0 0 3 3 】

コリネバクテリウム カルナエ、コリネバクテリウム エフィシエンズ、コリネバクテリウム カゼイ、コリネバクテリウム グルタミカム、コリネバクテリウム ウレイセレリボランス、コリネバクテリウム アルジェントラテンズ、コリネバクテリウム テルペノタバダム、ニューロスポラ クラサ、ロドコッカス オパクス、ロドコッカス エリスロポリスのpabABとしては、それぞれ、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、及び配列番号27に示す塩基配列からなるものが挙げられる。

【 0 0 3 4 】

pabBの類縁体について述べると、配列番号1、132～161のいずれかの塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAであり、かつパラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントI活性を有するポリペプチドをコードするDNAも使用できる。

【 0 0 3 5 】

pabCの類縁体について述べると、配列番号2～16のいずれかの塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAであり、かつ4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸リアーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAも使用できる。

【 0 0 3 6 】

pabAの類縁体について述べると、配列番号17、168～202のいずれかの塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAであり、かつパラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントII活性を有するポリペプチドをコードするDNAも使用できる。

【 0 0 3 7 】

pabBCの類縁体について述べると、配列番号129、162～167のいずれかの塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAであり、かつパラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントI活性及び4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸リアーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAも使用できる。

pabABの類縁体について述べると、配列番号18～27のいずれかの塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAであり、かつパラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントI活性及びパラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントII活性を有するポリペプチドをコードするDNAも使用できる。

【 0 0 3 8 】

本発明において、「ストリンジェントな条件」は、6×SSCの塩濃度のハイブリダイゼーション溶液中、50～60 の温度条件下、16時間ハイブリダイゼーションを行い、0.1×SSCの塩濃度の溶液中で洗浄を行う条件をいう。

【 0 0 3 9 】

10

20

30

40

50

また、pabBの類縁体について述べると、配列番号1、132～161のいずれかの塩基配列と90%以上、中でも95%以上、中でも98%以上の同一性を有する塩基配列からなるDNAであり、かつパラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントI活性を有するポリペプチドをコードするDNAも使用できる。

【0040】

pabCの類縁体について述べると、配列番号2～16のいずれかの塩基配列と90%以上、中でも95%以上、中でも98%以上の同一性を有する塩基配列からなるDNAであり、かつ4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸リアーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAも使用できる。

【0041】

pabAの類縁体について述べると、配列番号17、168～202のいずれかの塩基配列と90%以上、中でも95%以上、中でも98%以上の同一性を有する塩基配列からなるDNAであり、かつパラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントII活性を有するポリペプチドをコードするDNAも使用できる。

【0042】

pabBCの類縁体について述べると、配列番号129、162～167のいずれかの塩基配列と90%以上、中でも95%以上、中でも98%以上の同一性を有する塩基配列からなるDNAであり、かつパラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントI活性及び4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸リアーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAも使用できる。

【0043】

pabABの類縁体について述べると、配列番号18～27のいずれかの塩基配列と90%以上、中でも95%以上、中でも98%以上の同一性を有する塩基配列からなるDNAであり、かつパラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントI活性及びパラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントII活性を有するポリペプチドをコードするDNAも使用できる。

【0044】

本発明において、塩基配列の同一性は、GENETYX ver.8 (GENETYX 株式会社ゼネティックス製)により算出した値である。

【0045】

パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントI活性は、下記のようにして測定できる。

50 mM トリエタノールアミン(pH 8.5), 5% グリセロール、5 mM dithiothreitol (DTT), 5 mM MgCl₂, 250 mM NH₄Cl、0.1 mM コリスミ酸Ba, PabB (20U)で総液量3 mlにて反応させる。33 で反応開始後、2分おきに0.5 mlをサンプリングし、1N HCl を0.1 ml添加して反応を停止させる。生じた4-アミノデオキシコリスメート (ADC) を、島津製作所製HPLC(Prominence)を使用し、カラムはCosmosil packed column 5C18-AR-II (4.6 x 250 mm、ナカライテスク製)を用いてADCを分離して270 nmの波長で検出し、初速度から酵素活性を算出する。

また、PabAを共存させる場合は、20 U のPabAを添加して同様に反応させる。

【0046】

パラアミノ安息香酸シンセターゼ コンポーネントII活性は、下記のようにして測定できる。

50 mM Tris-HCl(pH 7.5), 5% グリセロール、5 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 250 mM NH₄Cl、10 mM L-グルタミン、Pab A (20U)で総液量3 mlにて反応させる。33 で反応開始後、2分おきに0.5 mlをサンプリングし、1N HCl を0.1 ml添加して反応を停止させる。生じたL-グルタミン酸は、島津製作所製HPLC(Prominence)を使用し、カラムはShim-Pack Amino-Na(6.0 x 100 mm、島津製作所製)を用いて反応生成物であるL-グルタミン酸を分離後、0-フタルアルデヒド標識して蛍光検出、定量し、初速度から酵素活性を算出する。

また、PabBとカップリングさせて測定する場合は、以下の方法を用いる。50 mM Tris-HCl(pH 7.5), 5% グリセロール、5 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 250 mM NH₄Cl、0.1 mM コリスミ酸Ba, 10 mM L-グルタミン、PabA(20U)、PabB(20U)で総液量3 mlにて反応させる。33 で

10

20

30

40

50

反応開始後、2分おきに0.5 mlをサンプリングし、1N HCl を0.1 ml添加して反応を停止させる。生じたADCは、島津製作所製HPLC(Prominence) を使用し、カラムはCosmosil packed column 5C18-AR-II (4.6 x 250 mm、ナカライテスク製) を用いてADCを分離して270 nmの波長で検出し、初速度から酵素活性を算出する。

【0047】

4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸リアーゼ活性は、PabBとのカップリング反応を利用して下記のようにして測定する。即ち、50 mM Tris-HCl(pH 7.5)、5% グリセロール、5 mM DTT、5 mM MgCl₂、250 mM NH₄Cl、0.1 mM コリスミ酸Ba、PabB (200U)、PabC(20U)で総液量3 mlにて反応させる。33 で反応開始後、2分おきに0.5 mlをサンプリングし、1N HCl を0.1 ml添加して反応を停止させる。生じたパラアミノ安息香酸は、島津製作所製HPLC (Prominence) を使用し、カラムはCosmosil packed column 5C18-AR-II (4.6 x 250 mm、ナカライテスク製) を用いてパラアミノ安息香酸を分離して254 nmの波長で検出し、初速度から酵素活性を算出する。

【0048】

塩基配列1~27, 129, 132~202のいずれかの塩基配列からなるDNAの類縁体は、例えば、これらの塩基配列に基づき常法に従い設計したプライマー又はプローブを用いたPCR又はハイブリダイゼーションにより、他生物種のDNAライブラリーから選択することができる。

【0049】

DAHPシンターゼ活性の強化

宿主のコリネ型細菌は、3-デオキシ-D-アラビノ-ヘプトソネート-7-リン酸(DAHP)シンターゼの活性が野生型コリネ型細菌より増強されたものであることが望ましい。

DAHPシンターゼは、エリスロース-4-リン酸(E4P)とホスホエノールピルビン酸(PEP)とから芳香族化合物生合成共通経路の初発代謝産物であるDAHPを生成する酵素である。

DAHPシンターゼ活性は、DAHPシンターゼ遺伝子の導入、又はコリネ型細菌の染色体上のDAHPシンターゼ遺伝子の制御配列および遺伝子コード領域への変異導入若しくは配列置換により、この遺伝子発現量を増大させ、または、この遺伝子産物の活性を増大させることにより増強することができる。

このうち、DAHPシンターゼ遺伝子の導入によりDAHPシンターゼ活性を増強することが簡便で効率がよい。

【0050】

導入するDAHPシンターゼ遺伝子の由来は特に限定されないが、4-ABA生産効率が良い点で、コリネバクテリウムのDAHPシンターゼ遺伝子が好ましい。コリネバクテリウムのDAHPシンターゼ遺伝子としては、コリネバクテリウム グルタミカムのDAHPシンターゼ遺伝子aroG(配列番号203)が挙げられる。

また、エシェリヒア コリ(Escherichia coli)由来の遺伝子、中でも、エシェリヒア コリ(Escherichia coli)由来の遺伝子も好ましい。

エシェリヒア コリ由来のDAHPシンターゼ遺伝子としては、配列番号211の塩基配列からなるDNA(aroG^{S180F})がさらにより好ましい。この遺伝子は、エシェリヒア コリ由来のDAHPシンターゼ遺伝子の一つであるaroG遺伝子において、この遺伝子がコードするアミノ酸配列の180番目のセリンをフェニルアラニンに変異させる変異(S180F)が導入された遺伝子であり、その遺伝子産物が芳香族アミノ酸を含む芳香族化合物によるフィードバック阻害への耐性、及び、高いDAHPシンターゼ活性を示すことを、本発明者らが比較検討により見出している(未発表)。

【0051】

配列番号203と90%以上、中でも95%以上、中でも98%以上の同一性を有する塩基配列からなるDNAであり、かつDAHPシンターゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA、又は配列番号203と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジентな条件でハイブリダイズするDNAであり、かつDAHPシンターゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAも使用

10

20

30

40

50

できる。

DAHPシントラーゼ活性の有無は、ホスホエノールピルビン酸とエリトロース-4-リン酸を基質として反応させ、生じた3-デオキシ-D-アラビノ-ヘプツロソネート-7-リン酸(DAHP)を、チオバルピツール酸を用いた発色法(Appl. Environ. Microbiol., 74; 5497-5530 (2008))により定量することにより検出できる。

【0052】

コリスメートシントラーゼ活性の強化

本発明の形質転換体は、宿主のコリネ型細菌に、さらに、コリスメートシントラーゼをコードする遺伝子を導入したものであることが好ましい。コリスメートシントラーゼは、5-エノールピルピルシキミ酸3-リン酸からコリスミ酸への変換を触媒する酵素である。

10

【0053】

導入するコリスメートシントラーゼ遺伝子の由来は特に限定されないが、4-ABAの生産効率が良い点で、コリネバクテリウム属細菌、特にコリネバクテリウム グルタミカムのコリスメートシントラーゼ遺伝子が好ましい。

コリネバクテリウム グルタミカムのコリスメートシントラーゼ遺伝子としてはaroC(例えば、配列番号204)が知られている。

【0054】

配列番号204と90%以上、中でも95%以上、中でも98%以上の同一性を有する塩基配列からなるDNAであり、かつコリスメートシントラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA、又は配列番号204と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAであり、かつコリスメートシントラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAも使用できる。

20

【0055】

コリスメートシントラーゼ活性は、公知の方法(Kitzing, K. et al., Spectroscopic and Kinetic Characterization of the Bifunctional Chorismate Synthase from *Neurospora crassa*. J. Biol. Chem. 276: 42658-42666 (2001))に従って測定する。即ち、37において、100 mMリン酸カリウムバッファ(pH 7.6)、4 mM MgSO₄、10 mM グルタミン、30 mM 硫酸アンモニウム、1 mM DTT、0.01 mM FMN、0.08 mM EPSP、アントラニル酸シントラーゼの粗酵素液からなる反应用混合液に被験酵素液を添加することで反応を開始し、アントラニル酸シントラーゼとのカップリング反応によって生成するアントラニル酸の生成を示す390 nmの蛍光をF-2500 Fluorescence Spectrophotometer (日立社製)によってモニターし、初速度から酵素活性を算出する。FMNの還元は1 mMのNADPHを添加することによって行う。活性が検出される場合に、コリスメートシントラーゼ活性があると判定する。

30

【0056】

シキミ酸キナーゼ活性の強化

本発明の形質転換体は、宿主のコリネ型細菌に、さらに、シキミ酸キナーゼをコードする遺伝子を導入したものであることが好ましい。シキミ酸キナーゼは、シキミ酸からシキミ酸-3-リン酸への変換を触媒する酵素である。

【0057】

導入するシキミ酸キナーゼ遺伝子の由来は特に限定されないが、4-ABAの生産効率が良い点で、コリネバクテリウム属細菌、特にコリネバクテリウム グルタミカムのシキミ酸キナーゼ遺伝子が好ましい。

40

コリネバクテリウム グルタミカムのシキミ酸キナーゼ遺伝子としては、aroK(例えば、配列番号205)が知られている。

【0058】

配列番号205と90%以上、中でも95%以上、中でも98%以上の同一性を有する塩基配列からなるDNAであり、かつシキミ酸キナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA、又は配列番号205と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAであり、かつシキミ酸キナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAも使用できる。

50

【 0 0 5 9 】

シキミ酸キナーゼ活性は、公知の方法(Cheng, WC. et al., Structures of Helicobacter pylori shikimate kinase reveal a selective inhibitor-induced-fit mechanism. PLoS ONE. 7: e33481 (2012))に従って測定する。即ち、25 において、100 mM トリス塩酸バッファー (pH 7.5)、50 mM KCl、5 mM MgCl₂、1.6 mM シキミ酸、2.5 mM ATP、1 mM phosphoenolpyruvate、0.1 mM NADH、ピルビン酸キナーゼの粗酵素液、乳酸デヒドロゲナーゼの粗酵素液からなる反应用混合液に被験酵素液を添加することで反応を開始し、ピルビン酸キナーゼおよび乳酸デヒドロゲナーゼとのカップリング反応によって減少するNADHの340 nmの吸収をBeckman DU800 spectrophotometer (ベックマン・コールター社製)によってモニターし、初速度から酵素活性を算出する。活性が検出される場合に、シキミ酸キナーゼ活性があると判定する。

10

【 0 0 6 0 】

3-デヒドロキナ酸シンターゼ活性の強化

本発明の形質転換体は、宿主のコリネ型細菌に、さらに、3-デヒドロキナ酸(DHQ)シンターゼをコードする遺伝子を導入したものであることが好ましい。デヒドロキナ酸シンターゼは、DAHPの3-デヒドロキナ酸への変換を触媒する酵素である。

【 0 0 6 1 】

導入する3-デヒドロキナ酸シンターゼ遺伝子の由来は特に限定されないが、4-ABAの生産効率が良い点で、コリネバクテリウム属細菌、特にコリネバクテリウム グルタミカムの3-デヒドロキナ酸シンターゼ遺伝子が好ましい。

20

コリネバクテリウム グルタミカムの3-デヒドロキナ酸シンターゼ遺伝子としてはaroB (例えば、配列番号206)が知られている。

【 0 0 6 2 】

配列番号206と90%以上、中でも95%以上、中でも98%以上の同一性を有する塩基配列からなるDNAであり、かつデヒドロキナ酸シンターゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA、又は配列番号206と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAであり、かつデヒドロキナ酸シンターゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAも使用できる。

【 0 0 6 3 】

デヒドロキナ酸シンターゼ活性は、公知の方法 (Meudi, S. et al., Dehydroquinase synthase from Escherichia coli, and its substrate 3-deoxy-D-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate. Methods. Enzymol. 142: 306-314 (1987))に従って測定する。即ち、33 において、50 mMリン酸カリウムバッファー(pH 7.0)、0.2 mM DAHP、0.2 mM NAD⁺、1 mM Cobalt(II) chloride · 6H₂O、3-DHQデヒドラターゼの粗酵素液からなる反应用混合液に被験酵素液を添加することで反応を開始し、3-DHQデヒドラターゼとのカップリング反応によって生成する3-DHSの生成を示す234 nmの吸収 (=12000/M · cm)をBeckman DU800 spectrophotometer (ベックマン・コールター社製)によってモニターする。33 において、1分間に1 μmolの3-DHQが生成される活性を、1 unitのデヒドロキナ酸シンターゼ活性とし、活性が検出される場合に、デヒドロキナ酸シンターゼ活性があると判定する。

30

【 0 0 6 4 】

形質転換体のためのベクターの構築

上記説明した導入遺伝子をPCRで増幅し、コリネ型細菌内で増幅できる適切なベクターにクローニングすればよい。

40

プラスミドベクターは、コリネ型細菌内で自律複製機能を司る遺伝子を含むものであれば良い。その具体例としては、ブレヴィバクテリウム ラクトファーマンタム (Brevibacterium lactofermentum) 2256由来のpAM330 [特開昭58 - 67699号公報]、[Miwa, K. et al., Cryptic plasmids in glutamic acid-producing bacteria. Agric. Biol. Chem. 48:2901-2903 (1984)] 及び [Yamaguchi, R. et al., Determination of the complete nucleotide sequence of the Brevibacterium lactofermentum plasmid pAM330 and the analysis of its genetic information. Nucleic Acids Symp. Ser. 16:265-267 (1985)]、

50

コリネバクテリウム グルタミカム ATCC3058由来のpHM1519 [Miwa, K. et al., Cryptic plasmids in glutamic acid-producing bacteria. Agric. Biol. Chem. 48:2901-2903 (1984)] 及びpCRY30 [Kurusu, Y. et al., Identification of plasmid partition function in coryneform bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 57:759-764 (1991)]、コリネバクテリウム グルタミカム T250由来のpCG4 [特開昭57-183799号公報]、[Katsumata, R. et al., Protoplast transformation of glutamate-producing bacteria with plasmid DNA. J. Bacteriol., 159:306-311 (1984)]、pAG1、pAG3、pAG14、pAG50 [特開昭62-166890]、pEK0、pEC5、pEKEx1 [Eikmanns, B.J. et al., A family of Corynebacterium glutamicum/Escherichia coli shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing. Gene, 102:93-98 (1991)] 等が挙げられる

10

。好ましいプロモーターとしては、コリネバクテリウム グルタミカムR由来のグリセルアルデヒド3-フォスフェートデヒドロゲナーゼA 遺伝子(gapA)のプロモーターPgapA、マレートデヒドロゲナーゼ遺伝子(mdh)のプロモーターPmdh、ラクテートデヒドロゲナーゼA 遺伝子(ldhA)のプロモーターPldhA等が挙げられ、中でも、PgapAが好ましい。

好ましいターミネーターとしては、大腸菌rRNAオペロンのrrnB T1T2 ターミネーター、大腸菌のtrpA ターミネーター、ブレヴィバクテリウム ラクトファーマンタム(Brevibacterium lactofermentum)のtrp ターミネーター等が挙げられ、中でも、rrnB T1T2 ターミネーターが好ましい。

【0065】

20

形質転換

形質転換方法は、公知の方法を制限なく使用できる。このような公知の方法として、例えば、塩化カルシウム・塩化ルビジウム法、リン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン介在トランスフェクション、電気パルス法などがあげられる。なかでも、コリネ型細菌には、電気パルス法が好適であり、電気パルス法は公知の方法により行うことができる(Kurusu, Y. et al., Electroporation-transformation system for Coryneform bacteria by auxotrophic complementation. Agric. Biol. Chem. 54: 443-447 (1990))。

【0066】

形質転換体は、微生物の培養に通常使用される培地を用いて培養すればよい。この培地としては、通常、炭素源、窒素源、無機塩類、及びその他の栄養物質等を含む天然培地、または合成培地を用いることができる。

30

炭素源としては、グルコース、フラクトース、スクロース、マンノース、マルトース、マンニトール、キシロース、アラビノース、ガラクトース、でんぷん、糖蜜、ソルビトール、グリセリン等の糖質または糖アルコール；酢酸、クエン酸、乳酸、フマル酸、マレイン酸またはグルコン酸等の有機酸；エタノール、プロパノール等のアルコールが挙げられる。炭素源は、1種を単独で使用でき、または2種以上を混合してもよい。培地中のこれら炭素源の濃度は、通常、約0.1~10 (w/v %) とすればよい。

【0067】

窒素源としては、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、酢酸アンモニウム等の無機または有機アンモニウム化合物、尿素、アンモニア水、硝酸ナトリウム、硝酸カリウム等が挙げられる。また、コーンステープリカー、肉エキス、ペプトン、NZ-アミン、タンパク質加水分解物、アミノ酸等の含窒素有機化合物等も利用できる。窒素源は、1種を単独で使用してもよく、また2種以上を混合して使用してもよい。培地中の窒素源濃度は、使用する窒素化合物によっても異なるが、通常、10 (w/v %) とすればよい。

40

【0068】

無機塩類としては、例えばリン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硝酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸亜鉛、硫酸コバルト、または炭酸カルシウム等が挙げられる。これら無機塩は、1種を単独で使用してもよく、また2種以上を混合して使用してもよい。培地中の無機塩類濃度は、使用する無機塩によっても異なる

50

が、通常、約0.1~1 (w/v %) とすればよい。

栄養物質としては、例えば肉エキス、ペプトン、ポリペプトン、酵母エキス、乾燥酵母、コーンステイープリカー、脱脂粉乳、脱脂大豆塩酸加水分解物、または動植物もしくは微生物菌体のエキスやそれらの分解物等が挙げられるが、通常、約0.1~10 (w/v %) とすればよい。更に、必要に応じて、ビタミン類を添加することもできる。ビタミン類としては、例えばビオチン、チアミン (ビタミンB1)、ピリドキシン (ビタミンB6)、パントテン酸、イノシトール、ニコチン酸等が挙げられる。

培地のpHは約5~9が好ましい。

【0069】

好ましい微生物培養培地としては、A培地 [Inui, M. et al., Metabolic analysis of *Corynebacterium glutamicum* during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 7:182-196 (2004)]、BT培地 [Omumasaba, C.A. et al., *Corynebacterium glutamicum* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoforms with opposite, ATP-dependent regulation. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 8:91-103 (2004)] 等が挙げられる。

培養温度は約15~45 とすればよく、培養時間は約1~7日とすればよい。

【0070】

(2) 4-ABA又はその塩の製造方法

上記説明した本発明の形質転換体を、糖類を含有する反応液中で培養又は反応させて4-ABA又はその塩を生産させる工程を含む方法により4-ABA又はその塩を製造することができる。

糖類としては、グルコースが好適であるが、代謝によりグルコースを生成し得る糖類も使用できる。このような糖類にはグルコース単位を有するオリゴ糖又は多糖類が含まれる。このような糖類としては、フルクトース、マンノース、アラビノース、キシロース、ガラクトースなどの単糖類；セロビオース、ショ糖、ラクトース、マルトース、トレハロース、セロビオース、キシロビオースなどの二糖類；デキストリン又は可溶性澱粉などの多糖類などが挙げられる。

また、例えばこれらの原料化合物を含む原料として、糖蜜も用いることができる。また、わら (稲わら、大麦わら、小麦わら、ライ麦わら、オート麦わら等)、バガス、コーンストーバー等の非可食農産廃棄物や、スイッチグラス、ネピアグラス、ミスキャンサス等のエネルギー作物や、木くず、古紙などを糖化酵素などで糖化した、グルコースなどの複数の糖を含む糖化液を用いることもできる。

【0071】

微生物の増殖

糖類を含む培地での培養、即ち反応に先立ち、形質転換体を好気条件下で、温度約25~38 で、約12~48時間培養して増殖させることが好ましい。

【0072】

培養用培地

反応に先立つ形質転換体の好氣的培養に用いる培地は、炭素源、窒素源、無機塩類およびその他の栄養物質等を含有する天然培地または合成培地を用いることができる。

炭素源として、糖類 (グルコース、フルクトース、マンノース、キシロース、アラビノース、ガラクトースのような単糖；スクロース、マルトース、ラクトース、セロビオース、キシロビオース、トレハロースのような二糖；澱粉のような多糖；糖蜜等)、マンニトール、ソルビトール、キシリトール、グリセリンのような糖アルコール；酢酸、クエン酸、乳酸、フマル酸、マレイン酸、グルコン酸のような有機酸；エタノール、プロパノールのようなアルコール；ノルマルパラフィンのような炭化水素等も用いることができる。

炭素源は、1種を単独で、又は2種以上を混合して使用できる。

【0073】

窒素源としては、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、酢酸アンモニウムのような無機又は有機アンモニウム化合物、尿素、アンモニア水、硝酸ナトリウ

10

20

30

40

50

ム、硝酸カリウム等を使用できる。また、コーンスティープリカー、肉エキス、ペプトン、NZ-アミン、蛋白質加水分解物、アミノ酸等の含窒素有機化合物等も使用できる。窒素源は、1種を単独で、又は2種以上を混合して使用できる。窒素源の培地中の濃度は、使用する窒素化合物によっても異なるが、通常、約0.1~10 (w/v %)とすればよい。

無機塩類としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硝酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸亜鉛、硫酸コバルト、炭酸カルシウム等が挙げられる。無機塩は、1種を単独で、又は2種以上を混合して使用できる。無機塩類の培地中の濃度は、使用する無機塩によっても異なるが、通常、約0.01~1 (w/v %)とすればよい。

【0074】

栄養物質としては、肉エキス、ペプトン、ポリペプトン、酵母エキス、乾燥酵母、コーンスティープリカー、脱脂粉乳、脱脂大豆塩酸加水分解物、動植物又は微生物菌体のエキスやそれらの分解物等が挙げられる。栄養物質の培地中の濃度は、使用する栄養物質によっても異なるが、通常約0.1~10 (w/v %)とすればよい。

さらに、必要に応じて、ビタミン類を添加することもできる。ビタミン類としては、ビオチン、チアミン(ビタミンB1)、ピリドキシン(ビタミンB6)、パントテン酸、イノシトール、ニコチン酸等が挙げられる。

培地のpHは約5~9が好ましい。

【0075】

具体的な好ましいコリネ型細菌用培地としては、A培地 [Inui, M. et al., Metabolic analysis of *Corynebacterium glutamicum* during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 7:182-196 (2004)]、BT培地 [Omumasaba, C.A. et al., *Corynebacterium glutamicum* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoforms with opposite, ATP-dependent regulation. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 8:91-103 (2004)]等が挙げられる。これらの培地において、糖類濃度を上記範囲にして用いればよい。

【0076】

培養液又は反応液

培養液又は反応液としては、炭素源、窒素源、及び無機塩類等を含有する天然反応液または合成反応液を用いることができる。

炭素源としては、上記説明した糖類又はそれを含む糖蜜や糖化液などを用いればよい。また、炭素源として、糖類の他に、マンニトール、ソルビトール、キシリトール、グリセリンのような糖アルコール；酢酸、クエン酸、乳酸、フマル酸、マレイン酸、グルコン酸のような有機酸；エタノール、プロパノールのようなアルコール；ノルマルパラフィンのような炭化水素等も用いることができる。

炭素源は、1種を単独で、又は2種以上を混合して使用できる。

反応液中の原料化合物である糖類の濃度は、約1~20 (w/v %)が好ましく、約2~10 (w/v %)がより好ましく、約2~5 (w/v %)がさらに好ましい。

また、原料の糖類を含む全炭素源の濃度は、約2~5 (w/v %)とすればよい。

【0077】

窒素源としては、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、酢酸アンモニウムのような無機又は有機アンモニウム化合物、尿素、アンモニア水、硝酸ナトリウム、硝酸カリウム等を使用できる。また、コーンスティープリカー、肉エキス、ペプトン、NZ-アミン、蛋白質加水分解物、アミノ酸等の含窒素有機化合物等も使用できる。窒素源は、1種を単独で、又は2種以上を混合して使用できる。窒素源の反応液中の濃度は、使用する窒素化合物によっても異なるが、通常、約0.1~10 (w/v %)とすればよい。

無機塩類としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硝酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸亜鉛、硫酸コバルト、炭酸カルシウム等が挙げられる。無機塩は、1種を単独で、又は2種以上を混合して使用できる。無機塩類の反応液中の濃度は、使用する無機塩によっても異なるが、通常、約0.01~1 (w/v %)とすればよい。

10

20

30

40

50

とすればよい。

【0078】

さらに、必要に応じて、ビタミン類を添加することもできる。ビタミン類としては、ピオチン、チアミン（ビタミンB1）、ピリドキシン（ビタミンB6）、パントテン酸、イノシトール、ニコチン酸等が挙げられる。

反応液のpHは約5~9が好ましい。

【0079】

具体的な好ましいコリネ型細菌用反応液としては、前述したBT培地等が挙げられる。これらの培地において、糖類濃度を上記範囲にして用いればよい。

【0080】

培養条件又は反応条件

培養温度又は反応温度、即ち形質転換体の生存温度は、約20~50 が好ましく、約25~47 がより好ましい。上記温度範囲であれば、効率良く4-HBAを製造できる。

また、培養又は反応時間は、約1~7日間が好ましく、約1~3日間がより好ましい。

培養は、バッチ式、流加式、連続式の何れでもよい。中でも、バッチ式が好ましい。

反応は、好氣的条件で行ってもよく、還元条件で行ってもよい。本発明の形質転換体自体の4-ABA生産能力は、好氣的条件下の方が高い。しかし、好氣的条件下では形質転換体が増殖するため、原料化合物が増殖のために消費され、その分、4-ABA製造効率が低下する。

従って、好氣的、かつ形質転換体が増殖しない条件下で反応を行うのが好ましい。本発明で増殖しないことには、実質的に増殖しないこと、又は殆ど増殖しないことが含まれる。例えば、微生物の増殖に必須の化合物であるピオチン、チアミンなどのビタミン類、窒素源などの1種以上を欠乏、或いは制限させた反応液を用いることにより、形質転換体の増殖を回避または抑制できる。

【0081】

また、還元条件では、コリネ型細菌は実質的に増殖しないため、原料化合物が増殖のために消費されない分、4-ABA製造効率が高くなる。

還元条件は、反応液の酸化還元電位で規定される。反応液の酸化還元電位は、約 - 200 mV ~ - 500 mVが好ましく、約 - 150 mV ~ - 500 mVがより好ましい。

反応液の還元状態は簡便にはレサズリン指示薬（還元状態であれば、青色から無色への脱色）で推定できるが、正確には酸化還元電位差計（例えば、BROADLEY JAMES社製、ORP Electrodes）を用いて測定できる。

【0082】

還元条件にある培養液又は反応液の調整方法は、公知の方法を制限なく使用できる。例えば、反応液の液体媒体として、蒸留水などの代わりに反応液用水溶液を使用してもよく、反応液用水溶液の調整方法は、例えば硫酸還元微生物などの絶対嫌気性微生物用の培養液調整方法（Pfennig, N. et al., (1981) : The dissimilatory sulfate-reducing bacteria, In The Prokaryotes, A Handbook on Habitats Isolation and Identification of Bacteria, Ed. by Starr, M. P. et al., p926-940, Berlin, Springer Verlag.）や「農芸化学実験書 第三巻、京都大学農学部 農芸化学教室編、1990年第26刷、産業図書株式会社出版」などが参考となり、所望する還元条件下の水溶液を得ることができる。

具体的には、蒸留水などを加熱処理や減圧処理して溶解ガスを除去することにより、還元条件の反応液用水溶液を得ることができる。この場合、約10 mmHg以下、好ましくは約5 mmHg以下、より好ましくは約3 mmHg以下の減圧下で、約1~60分程度、好ましくは約5~40分程度、蒸留水などを処理することにより、溶解ガス、特に溶解酸素を除去して還元条件下の反応液用水溶液を作成することができる。

また、適当な還元剤（例えば、チオグリコール酸、アスコルビン酸、システイン塩酸塩、メルカプト酢酸、チオール酢酸、グルタチオン、硫化ソーダ等）を添加して還元条件の反応液用水溶液を調整することもできる。

これらの方法を適宜組み合わせることも有効な還元条件の反応液用水溶液の調整方法で

10

20

30

40

50

ある。

【0083】

還元条件下で反応させる場合は、反応中も反応液を還元条件に維持することが好ましい。反応途中での還元条件を維持するために、反応系外からの酸素の混入を可能な限り防止することが望ましく、具体的には、反応系を窒素ガス等の不活性ガスや炭酸ガス等で封入する方法が挙げられる。酸素混入をより効果的に防止する方法としては、反応途中において本発明の好気性細菌の菌体内の代謝機能を効率よく機能させるために、反応系のpH維持調整液の添加や各種栄養素溶解液を適宜添加する必要が生じる場合もあるが、このような場合には添加溶液から酸素を予め除去しておくことが有効である。

【0084】

上記のようにして培養することにより、培養液又は反応液中に4-ABA又はその塩が生産される。

4-ABAの塩は、培地又は反応液の成分によっても異なるが、アルカリ金属塩（ナトリウム塩、カリウム塩など）、アルカリ土類金属塩（マグネシウム塩、カルシウム塩など）が挙げられる。

【実施例】

【0085】

[参考例1]

生産物存在下においてコリネ型細菌が他の微生物より高い耐性を示すことの検証

Corynebacterium glutamicum, *Escherichia coli*, *Streptomyces lividans*, *Pseudomonas putida*, 及び *Saccharomyces cerevisiae* について、好気培養におけるパラアミノ安息香酸の増殖阻害実験を行った。なお、本試験に用いた *Pseudomonas putida* S12は、これまでにパラアミノ安息香酸生産宿主として報告された例はないが、溶媒耐性菌として報告されておりパラアミノ安息香酸耐性に優れている可能性が考えられたため、比較用に用いた。

Corynebacterium glutamicum R株を4%のグルコースを含んだ前記A寒天培地に塗布し、33℃で15時間暗所に静置した。上記のプレート上で増殖したコリネバクテリウム グルタミカムを4%のグルコースを含んだ前記A液体培地10 mlの入った試験管に一白金耳植菌し、33℃にて15時間、好氣的に振とう培養を行った。上記条件で増殖したコリネバクテリウム グルタミカムを、4%のグルコースを含んだ前記A液体培地10 mlに初期菌体濃度 $OD_{610} = 0.05$ となるように植菌し、同時にパラアミノ安息香酸が終濃度0, 100, 200, 300, 400 mMとなるように添加し、33℃にて好氣的に振とう培養を行った。菌体の増殖は、 OD_{610} を測定することにより行った。

Escherichia coli JM109株をLB寒天培地 [1%ポリペプトン、0.5%酵母エキス、0.5% 塩化ナトリウム、及び1.5%寒天] に塗布し、37℃、15時間暗所に静置した。上記プレートで増殖した *Escherichia coli* をLB液体培地 [1%ポリペプトン、0.5%酵母エキス、及び0.5% 塩化ナトリウム] に植菌し、37℃、13時間、好氣的に振とう培養を行った。上記条件で増殖した *Escherichia coli* をLB液体培地100 mlに初期菌体濃度 $OD_{610} = 0.05$ となるように植菌し、同時にパラアミノ安息香酸濃度が終濃度0, 100, 200, 300, 400 mMとなるように添加し、37℃にて好氣的に振とう培養を行った。菌体の増殖は、 OD_{610} を測定することにより行った。

Streptomyces lividans 1326株をLB寒天培地に塗布し、28℃、24時間暗所に静置した。上記プレートで増殖した *Streptomyces lividans* をLB液体培地に植菌しコイルを加えて、28℃、24時間好氣的に振とう培養を行った。上記条件で増殖した *Streptomyces lividans* をLB液体培地10 mlに初期菌体濃度 $OD_{610} = 0.2$ となるように植菌しコイルを加え、同時にパラアミノ安息香酸濃度が終濃度0, 100, 200, 300 mMとなるように添加し、28℃にて好氣的に振とう培養を行った。菌体の増殖は、 OD_{610} を測定することにより行った。

Pseudomonas putida S12株を前記LB寒天培地に塗布し、30℃、15時間暗所に静置した。上記プレートで増殖した *Pseudomonas putida* を前記LB液体培地に植菌し、30℃、13時間、好氣的に振とう培養を行った。上記条件で増殖した *Pseudomonas putida* を前記LB液体培地

10

20

30

40

50

100 mlに初期菌体濃度 $OD_{610} = 0.05$ となるように植菌し、同時にパラアミノ安息香酸濃度が終濃度0, 100, 200, 300 mMとなるように添加し、30 にて好氣的に振とう培養を行った。菌体の増殖は、 OD_{610} の吸光度を測定することにより行った。

Saccharomyces cerevisiae W303株をYEPD寒天培地 [2%ポリペプトン、1%酵母エキス、2%グルコース、及び1.5%寒天] に塗布し、30、20時間暗所に静置した。上記プレートで増殖した*Saccharomyces cerevisiae*をYEPD液体培地 [2%ポリペプトン、1%酵母エキス、及び2%グルコース] に植菌し、30、13時間、好氣的に振とう培養を行った。上記条件で増殖した*Saccharomyces cerevisiae*を前記YEPD液体培地100 mlに初期菌体濃度 $OD_{610} = 0.05$ となるように植菌し、同時にパラアミノ安息香酸濃度が終濃度0, 100, 200, 300 mMとなるように添加し、30 にて好氣的に振とう培養を行った。菌体の増殖は、 OD_{610} を測定

10

【0086】

培地中へのパラアミノ安息香酸添加による好気増殖への影響の解析結果を図1に示す。

Escherichia coli JM109株は、100 mM パラアミノ安息香酸存在下で著しく増殖阻害を受け、300 mMでは、ほぼ完全に増殖が阻害された。

Streptomyces lividans 1326株は100 mM パラアミノ安息香酸存在下で著しく増殖阻害を受け、200 mMでは、ほぼ完全に増殖が阻害された。

Pseudomonas putida S12株 (溶媒耐性として報告されていた株) は、驚いたことに100 mM パラアミノ安息香酸という低濃度でほぼ完全に増殖が阻害された。

Saccharomyces cerevisiae W303株は、200 mMパラアミノ安息香酸によって増殖が強く

20

阻害され、300 mMパラアミノ安息香酸で極めて強く増殖が阻害された。これに対して、*Corynebacterium glutamicum* R株は、*Escherichia coli*、*Streptomyces lividans*、*Pseudomonas putida*、及び*Saccharomyces cerevisiae*の増殖がほぼ完全に阻害された300 mMのパラアミノ安息香酸存在下でも増殖可能であった。更に、*Corynebacterium glutamicum*は400 mMのパラアミノ安息香酸存在下でも増殖可能であり、ここには示さないが培養開始後24時間には200 mMパラアミノ安息香酸存在下における増殖と同等まで増殖した。

このように、*Corynebacterium glutamicum*は、パラアミノ安息香酸生産宿主として報告のある他の微生物や代表的な溶媒耐性菌と比較して、パラアミノ安息香酸に対して高い耐性を有し、パラアミノ安息香酸生産の宿主として高い適性を有することが示された。

30

【0087】

[参考例2]

生産物存在下においてコリネ型細菌が宿主として適していることの検証 (パラアミノ安息香酸による糖消費速度への影響)

参考例1で示したように*Corynebacterium glutamicum*は高濃度のパラアミノ安息香酸存在下でも増殖できる。ここではさらに、高濃度のパラアミノ安息香酸存在下でもグルコース消費速度への影響が極めて少ないことを以下の実験で示す。

Corynebacterium glutamicum R株を用いて、パラアミノ安息香酸がグルコース消費速度に与える影響を以下に述べる方法によって検討した。

野生株を2%のグルコースを含んだ前記A液体培地10 mlに植菌後、33 で18時間、好氣的に振盪培養を行った。同株を2%のグルコースを含んだ前記A液体培地100 mlに植菌後、33

40

で12時間、好氣的に振盪培養を行った。上記条件で増殖した株の菌体を遠心分離 (4, 3000 × g, 10分) により集菌し、得られた菌体を、1000 ml容量のジャーファーマンター培養槽内の、6%のグルコース、及び消泡剤 (ディスホームCB-442) 5 g/Lを含有する培養液 [(NH₄)₂SO₄ 21 g, KH₂PO₄ 0.5 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, 0.06% (w/v) FeSO₄ · 7H₂O + 0.042% (w/v) MnSO₄ · 2H₂O 1 mL, 0.02% (w/v) biotin solution 25 μL, 0.01% (w/v) thiamine solution 2 mL, yeast extract 2 g, vitamin assay casamino acid 7 gを蒸留水1 Lに溶解] 600 mlに $OD_{610} = 0.5$ となるように懸濁し、1000 ml容量ジャーファーマンターにより33、pH 7.0 (5.0 N アンモニア水の添加により制御)、通気量0.6 L/min (air, 1 vvm)、DO 10%の条

50

件において18時間通気攪拌培養を行った。

上記条件で増殖した株の菌体を遠心分離 (4 , 5000 × g, 10分) により集菌し、菌体を0.9% 塩化ナトリウム水溶液で1回洗浄した後、100 g 湿菌体/L (培地体積あたり湿菌体重量として10%) となるように、5%グルコースと0または50 mMまたは100 mMまたは200 mMのパラアミノ安息香酸を含む250 ml反応液 [(NH₄)₂SO₄ 7 g、KH₂PO₄ 0.5 g、K₂HPO₄ 0.5 g、MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g、0.06% (w/v) Fe₂SO₄ · 7H₂O + 0.042% (w/v) MnSO₄ · 2H₂O 1 ml、0.01% (w/v) thiamine solution 2 mlを蒸留水1 Lに溶解] に懸濁し、1000 ml容量ジャーファーマンターを用いて33 、pH 7.0 (5.0 N アンモニア水の添加により制御)、通気量0.25 L/min (air、1 vvm)、DO (溶存酸素) 5%の条件においてグルコース消費速度を比較した。反応液中のグルコース濃度は前記グルコースセンサーを用いてモニターした。その結果を図2に示す。

10

このように、*Corynebacterium glutamicum*は高濃度のパラアミノ安息香酸存在下でも糖消費速度はほとんど低下しなかった。参考例1と2を併せ、*Corynebacterium glutamicum*はパラアミノ安息香酸生産における宿主として際立って有用であることを示すことができた。

【0088】

[実施例1]

4-ABA生産株の構築

(1) 染色体DNAの調整・入手

4-ABA生産関連酵素遺伝子を取得するため、下記菌株から染色体DNAを調整または入手した。

20

コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) R (FERM P-18976)、エシェリヒア コリ (*Escherichia coli* K-12 MG1655)、エシェリヒア フェルグソニ (*Escherichia fergusonii* NBRC 102419)、サッカロファガス デグラダンス (*Saccharopagus degradans* ATCC 43961)、シェワネラ ウッディ (*Shewanella woodyi* ATCC 51908)、アースロバクター フェナンスレニボランス (*Arthrobacter phenanthrenivorans* JCM 16027)、アゾトバクター ビネランディ (*Azotobacter vinelandii* ATCC 9104)、オクロバクトラム アンスロピ (*Ochrobactrum anthropic* NBRC 15819)、クロストリジウム ベイジェリンキ (*Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052)、キセノルハブダス ボビエニ (*Xenorhabdus bovienii* ATCC 35271)、バチルス シュードフィルムス (*Bacillus pseudofirmus* JCM 9141)、バクテロイデス スライオタオミクロン (*Bacteroides thetaiotaomicron* JCM 5827)、フェリモナス バレアリカ (*Ferrimonas balearica* NBRC 104245)、エンテロバクター クロアカエ (*Enterobacter cloacae* NBRC 13535)、コリネバクテリウム カルナエ (*Corynebacterium callunae* JCM 9489)、コリネバクテリウム エフィシエンス (*Corynebacterium efficiens* NBRC 100395)、コリネバクテリウム カゼイ (*Corynebacterium casei* JCM 12072)、コリネバクテリウム ウレイセレリボランス (*Corynebacterium ureicelerivorans* JCM 15295)、コリネバクテリウム アルジェントラテンス (*Corynebacterium argentoratense* JCM 10392)、コリネバクテリウム テルペノタビダム (*Corynebacterium terpenotabidum* JCM 10555)、ニューロスポラ クラサ (*Neurospora crassa* ATCC 36373)、ロドコッカス オパクス (*Rhodococcus opacus* ATCC 51881)、ロドコッカス オパクス (*Rhodococcus erythropolis* ATCC 27854)、ラルストニア ユートロファ (*Ralstonia eutropha* IAM 12368)の染色体DNAは、菌株入手機関の情報に従って培養した後、DNAゲノム抽出キット (商品名: GenomicPrep Cells and Tissue DNA Isolation Kit、アマシャム社製) を用いて調整した。

30

40

アナバエナ バリアビリス (*Anabaena variabilis* ATCC 29413D-5)、カウロバクター クレセントス (*Caulobacter crescentus* ATCC 19089D-5)、シネココッカス種 (*Synechococcus* sp. ATCC 27264D-5)の染色体DNAは、ATCCより入手した。

【0089】

(2) 4-ABA生産関連遺伝子発現プラスミドの構築

目的の酵素遺伝子を単離するために用いたプライマー配列を表1に示す。PCRは、Veriti

50

サーマルサイクラー（アプライド・バイオシステムズ社製）を用い、反応試薬としてPrimeSTAR HS DNA Polymerase（タカラバイオ株式会社製）を用いた。

得られたDNA断片を、PgapAプロモーターを含有するクローニングベクター（pCRB207 [Hasegawa S et al., Improvement of the redox balance increases L-valine production by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation conditions. Appl Environ Microbiol. 78(3):865-875 (2012)]、pCRB209 [国際公開 WO2012/033112]、pCRB210 [国際公開 WO2012/033112]、pCRB240) に導入した。

【 0 0 9 0 】

【表 1】

4-ABA 生産関連遺伝子単離用プライマー

遺伝子源	酵素遺伝子	Forward	Reverse
<i>Escherichia coli</i>	pabC	配列番号 28	配列番号 29
<i>Escherichia fergusonii</i>	pabC	配列番号 30	配列番号 31
<i>Saccharophagus degradans</i>	pabC	配列番号 32	配列番号 33
<i>Shewanella woodyi</i>	pabC	配列番号 34	配列番号 35
<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i>	pabC	配列番号 36	配列番号 37
<i>Anabaena variabilis</i>	pabC	配列番号 38	配列番号 39
<i>Azotobacter vinelandii</i>	pabC	配列番号 40	配列番号 41
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	pabC	配列番号 42	配列番号 43
<i>Clostridium beijerinckii</i>	pabC	配列番号 44	配列番号 45
<i>Xenorhabdus bovienii</i>	pabC	配列番号 46	配列番号 47
<i>Bacillus pseudofirmus</i>	pabC	配列番号 48	配列番号 49
<i>Caulobacter crescentus</i>	pabC	配列番号 50	配列番号 51
<i>Synechococcus</i> sp.	pabC	配列番号 52	配列番号 53
<i>Bacteroides thraiotaoomicron</i>	pabC	配列番号 54	配列番号 55
<i>Ferrimonas balearica</i>	pabC	配列番号 56	配列番号 57
<i>Enterobacter cloacae</i>	pabA	配列番号 58	配列番号 59
<i>Corynebacterium callunae</i>	pabAB	配列番号 60	配列番号 61
<i>Corynebacterium efficiens</i>	pabAB	配列番号 62	配列番号 63
<i>Corynebacterium casei</i>	pabAB	配列番号 64	配列番号 65
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	pabAB	配列番号 66	配列番号 67
<i>Corynebacterium ureicelerivorans</i>	pabAB	配列番号 68	配列番号 69
<i>Corynebacterium argentoratense</i>	pabAB	配列番号 70	配列番号 71
<i>Corynebacterium terpenotabidum</i>	pabAB	配列番号 72	配列番号 73
<i>Neurospora crassa</i>	pabAB	配列番号 74	配列番号 75
<i>Rhodococcus opacus</i>	pabAB	配列番号 76	配列番号 77
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	pabAB	配列番号 78	配列番号 79
<i>Ralstonia eutropha</i>	pabBC	配列番号 130	配列番号 131
<i>Escherichia coli</i>	aroG	配列番号 117	配列番号 118
<i>Escherichia coli</i>	aroG(S180F)	配列番号 119	配列番号 120
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	aroC, aroK, aroB	配列番号 121	配列番号 122
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	aroA	配列番号 123	配列番号 124
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	aroD	配列番号 125	配列番号 126
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	aroE	配列番号 127	配列番号 128

【 0 0 9 1 】

< pCRB240クローニングベクターの構築 >

10

20

30

40

50

Corynebacterium glutamicum R株由来のグリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼをコードするgapA遺伝子のプロモーター配列及びクローニングベクターpKK223-3 (ファルマシア社製) 由来rrnB T1T2双方向ターミネーター配列をpBL1 ori配列を含むベクターpCRB1 [J Mol Microbiol Biotechnol. 8(4):243-254 (2004)]に導入した。PgapA配列増幅には配列番号207及び208のプライマーを、ターミネーター配列の増幅には配列番号209及び210のプライマーを使用した。得られたPgapAプロモーターを含有するクローニングベクターをpCRB240と命名した。pCRB240の構築に使用したプライマー配列は、配列番号207、208、209及び210である。

【 0 0 9 2 】

導入したクローニングベクターと得られたプラスミド名を表2に示す。尚、aroCとaroKとaroBは染色体上で連続して同じ向きに配置されているため、まとめてクローニングを行った(配列番号113)。

【 0 0 9 3 】

【表 2】

4-ABA 生産関連遺伝子発現プラスミド

遺伝子源	酵素遺伝子	導入ベクター	プラスミド名
<i>Escherichia coli</i>	pabC	pCRB209	Pani151
<i>Escherichia fergusonii</i>	pabC	pCRB209	Pani159
<i>Saccharophagus degradans</i>	pabC	pCRB209	Pani161
<i>Shewanella woodyi</i>	pabC	pCRB209	Pani231
<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i>	pabC	pCRB209	Pani237
<i>Anabaena variabilis</i>	pabC	pCRB209	Pani240
<i>Azotobacter vinelandii</i>	pabC	pCRB207	Pani241
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	pabC	pCRB207	Pani243
<i>Clostridium beijerinckii</i>	pabC	pCRB209	Pani245
<i>Xenorhabdus bovienii</i>	pabC	pCRB209	Pani246
<i>Bacillus pseudofirmus</i>	pabC	pCRB207	Pani247
<i>Caulobacter crescentus</i>	pabC	pCRB207	Pani248
<i>Synechococcus</i> sp.	pabC	pCRB209	Pani249
<i>Bacteroides thraiotaoomicron</i>	pabC	pCRB209	Pani250
<i>Ferrimonas balearica</i>	pabC	pCRB207	Pani242
<i>Enterobacter cloacae</i>	pabA	pCRB209	Pani178
<i>Corynebacterium callunae</i>	pabAB	pCRB209	Pani198
<i>Corynebacterium efficiens</i>	pabAB	pCRB209	Pani190
<i>Corynebacterium casei</i>	pabAB	pCRB209	Pani206
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	pabAB	pCRB240	Pani1
<i>Corynebacterium ureicelerivorans</i>	pabAB	pCRB209	Pani251
<i>Corynebacterium argentoratense</i>	pabAB	pCRB209	Pani214
<i>Corynebacterium terpenotabidum</i>	pabAB	pCRB209	Pani213
<i>Neurospora crassa</i>	pabAB	pCRB209	Pani199
<i>Rhodococcus opacus</i>	pabAB	pCRB209	Pani212
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	pabAB	pCRB209	Pani211
<i>Ralstonia eutropha</i>	pabBC	pCRB209	Pani171
<i>Escherichia coli</i>	aroG	pCRB210	pSKM1
<i>Escherichia coli</i>	aroG(S180F)		pCRB237
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	aroC, aroK, aroB	pCRB209	pCRB270
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	aroA	pCRB207	pCRB271
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	aroD	pCRB209	pCRB272
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	aroE	pCRB209	pCRB273

コリネバクテリウム グルタミカム内で共存可能なプラスミド (pCRB1 [NCBI GenBank : AB444682]、pCRB15 [NCBI GenBank : AB444683]) に、上記表 1、表 2 に示す 4-ABA 生産

10

20

30

40

50

関連遺伝子発現プラスミドからPgapAプロモーター融合酵素遺伝子断片を取得し導入した。得られた4-ABA生産関連遺伝子プラスミドを表3に示す。

【0094】

【表3】

4-ABA 生産関連遺伝子発現プラスミド
(コリネバクテリウム グルタミカム内で共存可能)

遺伝子源	酵素遺伝子	導入ベクター	プラスミド名
<i>Enterobacter cloacae</i>	pabA	pCRB15	Pani187
<i>Neurospora crassa</i>	pabAB	pCRB1	Pani219
<i>Escherichia coli</i>	pabC	pCRB1	Pani191

10

【0095】

エシェリヒア コリ内で共存可能なプラスミド (pSTV28 [タカラバイオ株式会社製]) に、上記表2で構築した4-ABA生産関連遺伝子発現プラスミドからPgapAプロモーター融合酵素遺伝子断片を取得し導入した。得られた4-ABA生産関連遺伝子プラスミドを表4に示す。

【0096】

【表4】

4-ABA 生産関連遺伝子発現プラスミド
(エシェリヒア コリ内で共存可能)

遺伝子源	酵素遺伝子	導入ベクター	プラスミド名
<i>Escherichia coli</i>	pabC	pSTV28	Pani269

20

【0097】

(3) PABA生産関連遺伝子染色体導入株の構築

PABA生産関連遺伝子を*Corynebacterium glutamicum* R株の染色体にマーカーレスで導入するために必要なDNA領域を、*Corynebacterium glutamicum* R株の生育に必須でないと報告されている配列 [Appl. Environ. Microbiol. 71:3369-3372 (2005)] (SSI領域) を基に決定した。このDNA領域PCR法により増幅した。得られたDNA断片をマーカーレス遺伝子導入用プラスミドpCRA725 [J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 8:243-254 (2004)、(特開2006-124440)] に導入した。なお、pCRB260、pCRB263、pCRB265、pCRB266及びpCRB267は、インバース PCR法によりSSI領域に遺伝子を組み込むための制限酵素部位 (ユニークサイト) を導入した。SSI領域の単離及びインバースPCRに用いたプライマー配列および得られた染色体導入用ベクターを表5に示す。

30

【0098】

【表5】

SSI 領域を単離するために用いたプライマー配列
および得られた染色体導入用ベクター

染色体導入用ベクター	SSI 領域	Forward	Reverse
pCRB259	SSI 2-2	配列番号 80	配列番号 81
pCRB260	SSI 2-3	配列番号 82	配列番号 83
		配列番号 84*	配列番号 85*
pCRB261	SSI 2-4	配列番号 86	配列番号 87
pCRB262	SSI 3-3	配列番号 88	配列番号 89
pCRB263	SSI 4-7	配列番号 90	配列番号 91
		配列番号 92*	配列番号 93*
pCRB264	SSI 6-2	配列番号 94	配列番号 95
pCRB265	SSI 7	配列番号 96	配列番号 97
		配列番号 98*	配列番号 99*
pCRB266	SSI 8	配列番号 100	配列番号 101
		配列番号 102*	配列番号 103*
pCRB267	SSI 9-4	配列番号 104	配列番号 105
		配列番号 106*	配列番号 107*
pCRB268	SSI 10-2	配列番号 108	配列番号 109
pCRB269	SSI 10-3	配列番号 110	配列番号 111

10

20

* : インバースPCR法に使用したプライマー

【0099】

上述の染色体導入用プラスミドに、上記表2で構築した4-ABA生産関連遺伝子発現プラスミドからPgapAプロモーター融合酵素遺伝子断片を取得し導入した。得られた4-ABA生産関連遺伝子染色体導入用プラスミドを表6に示す。

30

【0100】

【表6】

4-ABA 生産関連遺伝子染色体導入用プラスミド

遺伝子源	遺伝子	SSI 領域	染色体導入用 プラスミド
<i>Escherichia coli</i>	pabC	SSI 2-2	LKSani16
<i>Escherichia coli</i>	pabC	SSI 3-3	LKSani15
<i>Corynebacterium callunae</i>	pabAB	SSI 7	LKSani44
<i>Corynebacterium callunae</i>	pabAB	SSI 8	LKSani45
<i>Corynebacterium callunae</i>	pabAB	SSI 10-2	LKSani47
<i>Corynebacterium callunae</i>	pabAB	SSI 6-2	LKSani46
<i>Escherichia coli</i>	aroG(S180F)	SSI 2-3	LKSphe21
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	aroC, aroK, aroB	SSI 9-4	LKSphe48
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	aroA	SSI 4-7	LKSphe22
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	aroD	SSI 10-3	LKSphe2
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	aroE	SSI 2-4	LKSani3

10

20

【0101】

(4) 染色体遺伝子組換えによる4-ABA生産株の構築

マーカーレス染色体遺伝子導入用ベクターpCRA725は、コリネバクテリウム グルタミカムR内で複製不能なプラスミドである。プラスミドpCRA725に導入したSSI領域と染色体上の相同領域との一重交叉株の場合、pCRA725上のカナマイシン耐性遺伝子の発現によるカナマイシン耐性と、バチルス サブチリス (*Bacillus subtilis*) のsacR-sacB遺伝子の発現によるスクロース含有培地での致死性を示すのに対し、二重交叉株の場合、pCRA725上のカナマイシン耐性遺伝子の脱落によるカナマイシン感受性と、sacR-sacB遺伝子の脱落によるスクロース含有培地での生育性を示す。従って、マーカーレス染色体遺伝子導入株は、カナマイシン感受性及びスクロース含有培地生育性を示す。

30

上記方法により、上述した4-ABA生産関連遺伝子染色体導入用プラスミドを用いて4-ABA生産関連遺伝子染色体導入株を構築した。尚、本染色体遺伝子組換えの概要は、表7にまとめて示した。

【0102】

【表 7】

染色体遺伝子組換えによる 4-ABA 生産関連遺伝子導入株の構築

構築菌株名	宿主菌株名	組換えプラスミド	染色体導入遺伝子	染色体破壊遺伝子
ESani12	R	LKSani16	pabC	
ESani29	R	LKSani44	pabAB	
ESani32	ESani29	LKSani45	pabABx2	
ESani34	ESani32	LKSani47	pabABx3	
ESani41	ESani34	LKSani46	pabABx4	
ESani13	ESani12	LKSani15	pabCx2	
ESani16	ESani13	LKSphe21	pabCx2, aroG(S180F)	
ESani19	ESani16	LKSphe48	pabCx2, aroG(S180F), aroC, aroK, aroB	
ESani24	ESani19	LKSphe22	pabCx2, aroG(S180F), aroC, aroK, aroB, aroA	
ESani27	ESani24	LKSphe2	pabCx2, aroG(S180F), aroC, aroK, aroB, aroA, aroD	
ESani31	ESani27	LKSani3	pabCx2, aroG(S180F), aroC, aroK, aroB, aroA, aroD, aroE	
ESani33	ESani31	pCRA728	pabCx2, aroG(S180F), aroC, aroK, aroB, aroA, aroD, aroE	ldhA

10

20

30

aroG : Escherichia coli由来3 - デオキシ - D - アラビノ - ヘプツロソネート - 7 - リン酸 (DAHP) シンターゼ遺伝子(ここでは、配列番号112) の180番目のセリンをフェニルアラニンに置換した。

aroC : Corynebacterium glutamicum由来 コリスミ酸シンターゼ遺伝子

aroK : Corynebacterium glutamicum由来 シキミ酸キナーゼ遺伝子

aroB : Corynebacterium glutamicum由来 3-デヒドロキナ酸シンターゼ遺伝子

aroA : Corynebacterium glutamicum由来 3-ホスホシキミ酸 1-カルボキシビニルトランスフェラーゼ遺伝子(ここでは、配列番号114)

40

aroD : Corynebacterium glutamicum由来 3 - デヒドロキナ酸デヒドラターゼ遺伝子(ここでは、配列番号115)

aroE : Corynebacterium glutamicum由来 シキミ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子(ここでは、配列番号116)

ldhA : ラクテート (乳酸) デヒドロゲナーゼ破壊

【 0 1 0 3 】

(5) 4-ABA生産遺伝子発現プラスミド導入株の構築

上述のpabAB遺伝子発現プラスミドをpabC遺伝子染色体導入株 (ESani12) に、pabC遺伝子発現プラスミドをpabAB遺伝子染色体導入株 (ESani41) に導入することにより4-ABA生産株を構築した。

50

尚、本プラスミド導入株の概要は、表8及び表9にまとめて示した。

【 0 1 0 4 】

【表 8】

pabAB 遺伝子発現プラスミド導入株

構築菌株名	宿主菌株名	導入プラスミド	pabAB 遺伝子源
ANI 137	ESani12	Pani190	<i>Corynebacterium efficiens</i>
ANI 138	ESani12	Pani199	<i>Neurospora crassa</i>
ANI 139	ESani12	Pani192	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
ANI 140	ESani12	Pani198	<i>Corynebacterium callunae</i>
ANI 152	ESani12	Pani206	<i>Corynebacterium casei</i>
ANI 155	ESani12	Pani211	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
ANI 156	ESani12	Pani212	<i>Rhodococcus opacus</i>
ANI 157	ESani12	Pani213	<i>Corynebacterium terpenotabidum</i>
ANI 158	ESani12	Pani214	<i>Corynebacterium argentoratense</i>
ANI 205	ESani12	Pani251	<i>Corynebacterium ureicelerivorans</i>

10

【 0 1 0 5 】

【表 9】

pabC 遺伝子発現プラスミド導入株

構築菌株名	宿主菌株名	導入プラスミド	pabC 遺伝子源
ANI 207	ESani41	Pani151	<i>Escherichia coli</i>
ANI 208	ESani41	Pani159	<i>Escherichia fergusonii</i>
ANI 209	ESani41	Pani161	<i>Saccharophagus degradans</i>
ANI 210	ESani41	Pani231	<i>Shewanella woodyi</i>
ANI 211	ESani41	Pani235	<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i>
ANI 212	ESani41	Pani237	<i>Anabaena variabilis</i>
ANI 213	ESani41	Pani240	<i>Azotobacter vinelandii</i>
ANI 214	ESani41	Pani241	<i>Ochrobactrum anthropi</i>
ANI 215	ESani41	Pani243	<i>Clostridium beijerinckii</i>
ANI 216	ESani41	Pani245	<i>Xenorhabdus bovienii</i>
ANI 217	ESani41	Pani246	<i>Bacillus pseudofirmus</i>
ANI 218	ESani41	Pani247	<i>Caulobacter crescentus</i>
ANI 219	ESani41	Pani248	<i>Synechococcus sp.</i>
ANI 220	ESani41	Pani249	<i>Bacteroides thraiotaoomicron</i>
ANI 221	ESani41	Pani250	<i>Ferrimonas balearica</i>
ANI 222	ESani41	Pani259	<i>Escherichia coli</i>

30

40

【 0 1 0 6 】

表5に示した4-ABA生産関連遺伝子導入株にpabAB発現プラスミド(Pani198)を導入することにより、代謝経路を強化した4-ABA生産株を構築した。尚、本代謝経路強化4-ABA生産株の概要は、表10にまとめて示した。

50

【 0 1 0 7 】

【表 1 0】

代謝経路強化を施した 4-ABA 生産株

構築菌株名	宿主菌株名	導入プラスミド	pabAB 遺伝子源
ANI 162	ESani13	Pani198	Corynebacterium callunae
ANI 166	ESani16	Pani198	Corynebacterium callunae
ANI 179	ESani19	Pani198	Corynebacterium callunae
ANI 186	ESani24	Pani198	Corynebacterium callunae
ANI 187	ESani27	Pani198	Corynebacterium callunae
ANI 192	ESani31	Pani198	Corynebacterium callunae
ANI 198	ESani33	Pani198	Corynebacterium callunae

10

上述のpabA発現プラスミドとpabBC発現プラスミドをCorynebacterium glutamicum R株に同時に導入することにより、4-ABA生産株を構築した。また、上述のpabAB発現プラスミドとpabBC発現プラスミドを同時に導入することにより、4-ABA生産株を構築した。尚、本4-ABA生産株の概要は、表11にまとめて示した。

コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) ANI 198は、日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 (郵便番号292-0818) の独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターに国際寄託した (受託日: 2016年1月6日、受託番号: NITE BP-02188)。従って、この株は、公に利用可能である。

20

【 0 1 0 8 】

【表 1 1】

pabBC 遺伝子発現プラスミド導入株

構築菌株名	宿主菌株名	導入プラスミド1	導入プラスミド2
ANI 123	R	Pani187	Pani171
ANI 127	R	Pani219	Pani171

30

【 0 1 0 9 】

上述のpabAB発現プラスミドとpabC発現プラスミドをCorynebacterium glutamicum R株に同時に導入することにより、4-ABA生産株を構築した。また、上述のpabAB発現プラスミドとpabC発現プラスミドをEscherichia coli K-12 MG1655株に同時に導入することにより、宿主の異なる4-ABA生産株を構築した。尚、本4-ABA生産株の概要は、表12にまとめて示した。

【 0 1 1 0 】

【表 1 2】

宿主の異なる 4-ABA 生産株

構築菌株名	宿主菌株名	導入プラスミド1	導入プラスミド2
ANI 109	R	Pani198	Pani191
ANI 225	Escherichia coli	Pani198	Pani269

40

【 0 1 1 1 】

[実施例2] (pabABとpabCの組み合わせ)

試験管での生産試験 (10 mLスケール)

コリネバクテリウム グルタミカムR株のシキミ酸経路強化株である、ESani 33株をベースとして構築した、パラアミノ安息香酸生産株である、ANI 198株 (実施例1 (表10) 参照

50

) を用いて、試験管を用いた好気バッチ反応におけるパラアミノ安息香酸生産実験を以下に述べる方法によって行った。

ANI 198株を終濃度50 $\mu\text{g/mL}$ カナマイシンと4%のグルコースを含んだA寒天培地 [(NH₂)₂CO 2 g、(NH₄)₂SO₄ 7 g、KH₂PO₄ 0.5 g、K₂HPO₄ 0.5 g、MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g、0.06% (w/v) FeSO₄ · 7H₂O + 0.042% (w/v) MnSO₄ · 2H₂O 1 ml、0.02% (w/v) biotin solution 1 ml、0.01% (w/v) thiamin solution 2 ml、yeast extract 2 g、vitamin assay casamino acid 7 g、寒天 15 gを蒸留水1Lに溶解] に塗布し、33 $^{\circ}\text{C}$ 、15時間暗所に静置した。

上記のプレート上で増殖したANI 198株を終濃度50 $\mu\text{g/mL}$ カナマイシンと2%のグルコースを含んだA液体培地 [(NH₂)₂CO 2 g、(NH₄)₂SO₄ 7 g、KH₂PO₄ 0.5 g、K₂HPO₄ 0.5 g、MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g、0.06% (w/v) FeSO₄ · 7H₂O + 0.042% (w/v) MnSO₄ · 2H₂O 1 ml、0.02% (w/v) biotin solution 1 ml、0.01% (w/v) thiamin solution 2 ml、yeast extract 2 g、vitamin assay casamino acid 7 gを蒸留水1 Lに溶解] 10 mlの入った試験管に一白金耳植菌し、33 $^{\circ}\text{C}$ にて7-15時間、好氣的に振とう培養を行った。

上記条件で増殖した各株を、終濃度50 $\mu\text{g/mL}$ カナマイシンと4%のグルコースを含んだA液体培地10 mlに初期菌体濃度OD₆₁₀ = 0.5となるように懸濁し、200 mgのCaCO₃を加え33 $^{\circ}\text{C}$ にて48時間、好氣的に振とう培養を行った。48時間後の培養液を遠心分離 (4 $^{\circ}\text{C}$ 、15,000 \times g、5分) し、培養上清液を得た。培養上清液中の代謝物質濃度は、高速液体クロマトグラフィシステム (Prominence HPLC装置 (島津製作所製)、COSMOSIL Packed column 5C18-AR-11、移動相に20%メタノール、0.07%過塩素酸を用いて分離) により分析した。その結果、同株は48時間後、40.1 mMのパラアミノ安息香酸を生産した。

【 0 1 1 2 】

[実施例3]

コリネバクテリウム グルタミカム形質転換体によるジャーファーマンターでのパラアミノ安息香酸生産試験 (250 mLスケール)

(pabABとpabCの組み合わせ)

コリネバクテリウム グルタミカムR株のシキミ酸経路強化株である、ESani 22株をベースとして構築した、パラアミノ安息香酸生産株である、ANI 198株 (実施例1 (表10) 参照) を用いて、ジャーファーマンターを用いた好気フェドバッチ反応におけるパラアミノ安息香酸生産実験を以下に述べる方法によって行った。

ANI 198株を終濃度50 $\mu\text{g/mL}$ カナマイシンと2%のグルコースを含んだ前記A液体培地20 mlに植菌後、33 $^{\circ}\text{C}$ で18時間、好氣的に振盪培養を行った。

ANI 198株を終濃度50 $\mu\text{g/mL}$ カナマイシンと2%のグルコースを含んだ前記A液体培地100 mlに植菌後、33 $^{\circ}\text{C}$ で12時間、好氣的に振盪培養を行った。

上記条件で増殖した菌体を遠心分離 (4 $^{\circ}\text{C}$ 、3000 \times g、10分) により集菌し、得られた菌体を、1000 ml容量のジャーファーマンター培養槽内の、終濃度50 $\mu\text{g/mL}$ カナマイシンと6%のグルコース、及び消泡剤 (ディスホームCB-442) 5 g/Lを含有する培養液 [(NH₄)₂SO₄ 7 g、KH₂PO₄ 0.5 g、K₂HPO₄ 0.5 g、MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g、0.06% (w/v) FeSO₄ · 7H₂O + 0.042% (w/v) MnSO₄ · 2H₂O 1 ml、0.02% (w/v) biotin solution 25 μl 、0.01% (w/v) thiamin solution 2 ml、yeast extract 2 g、vitamin assay casamino acid 7 gを蒸留水1 Lに溶解] 600 mlにOD₆₁₀ = 0.5となるように懸濁し、1000 ml容量ジャーファーマンターにより33 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 7.0 (5.0 N アンモニア水の添加により制御)、通気量0.6 L/min (air、1 vvm)、溶存酸素濃度 (DO) 10% (大気圧下飽和溶存酸素濃度を100%として) の条件において18時間通気攪拌培養を行った。

上記条件で増殖した菌体を遠心分離 (4 $^{\circ}\text{C}$ 、5000 \times g、10分) により集菌し、菌体を0.9% 塩化ナトリウム水溶液で1回洗浄した後、100 g 湿菌体/L (培地体積あたり湿菌体重量として10%)となるように、7.2% グルコースを含む250 ml 反応液 [(NH₄)₂SO₄ 7 g、KH₂PO₄ 0.5 g、K₂HPO₄ 0.5 g、MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g、0.06% (w/v) Fe₂SO₄ · 7H₂O + 0.042% (w/v) MnSO₄ · 2H₂O 1 ml、0.01% (w/v) thiamine solution 2 mlを蒸留水1 Lに溶解] に懸濁し、1000 ml容量ジャーファーマンターを用いて33 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 7.0 (5.0 N アンモニア水の添加により制御)、通気量0.25 L/min (air、1 vvm)、DO 5%の条件においてパラアミノ安息

香酸生成反応を行った。なお、反応液中のグルコース濃度はグルコースセンサー（王子計測機器、BF-5i）を用いてモニターし、グルコースが枯渇する前にグルコースの追添加を行った。培養上清液中の代謝物質濃度は、前記の高速液体クロマトグラフィーシステムにより分析した。

その結果を図3に示す。ANI 198株は、パラアミノ安息香酸生成反応開始48時間後に、18.6 mM (25.5 g/l)のパラアミノ安息香酸（パラアミノ安息香酸生成速度 3.9 mM/h）を生成した。また、同株によるパラアミノ安息香酸生成反応時に菌体の増殖はほとんど認められなかった。これらの結果から、同株は、無機塩最少培地を用いる菌体増殖を伴わない反応プロセスにおいて、非常に高いパラアミノ安息香酸生産性を有することが示された。同株のパラアミノ安息香酸生産性は、糖からの発酵法による生産性としては、これまでに報告されている最も生産性の高い*Escherichia coli*組換え株の生産性35 mM (4.8 g/L) 48時間（特許文献1，非特許文献2）を大幅に上回った。

【0113】

[実施例4] (pabAとpabBCの組み合わせ)

試験管での生産試験 (10 mLスケール)

コリネバクテリウム グルタミカムR株をベースとして構築した、パラアミノ安息香酸生産株である、ANI 123株（実施例1（表11）参照）を用いて、試験管を用いた好気バッチ反応におけるパラアミノ安息香酸生産実験を以下に述べる方法によって行った。

ANI 123株を終濃度50 μ g/mLカナマイシンと5 μ g/mLクロラムフェニコールと4%のグルコースを含んだ前記A寒天培地に塗布し、33 $^{\circ}$ C、15時間暗所に静置した。

上記のプレート上で増殖した同株を終濃度50 μ g/mLカナマイシンと5 μ g/mLクロラムフェニコールと2%のグルコースを含んだ前記A液体培地10 mlの入った試験管に一白金耳植菌し、33 $^{\circ}$ Cにて7-15時間、好氣的に振とう培養を行った。

上記条件で増殖した各株を、終濃度50 μ g/mLカナマイシンと5 μ g/mLクロラムフェニコールと4%のグルコースを含んだ前記A液体培地10 mlに初期菌体濃度 $OD_{610} = 0.5$ となるように懸濁し、200 mgのCaCO₃を加え33 $^{\circ}$ Cにて48時間、好氣的に振とう培養を行った。48時間後の培養液を遠心分離（4 $^{\circ}$ C、15000 \times g、5分）し、得られた上清液について前記高速液体クロマトグラフィーシステムによりパラアミノ安息香酸の定量分析を行った。その結果、同株は48時間後、16.6 mMのパラアミノ安息香酸を生産した。

【0114】

[実施例5] (pabABとpabBCの組み合わせ)

試験管での生産試験 (10 mLスケール)

コリネバクテリウム グルタミカムR株をベースとして構築した、パラアミノ安息香酸生産株である、ANI 127株（実施例1（表11）参照）を用いて、試験管を用いた好気バッチ反応におけるパラアミノ安息香酸生産実験を以下に述べる方法によって行った。

ANI 127株を終濃度50 μ g/mLカナマイシンと5 μ g/mLクロラムフェニコールと4%のグルコースを含んだ前記A寒天培地に塗布し、33 $^{\circ}$ C、15時間暗所に静置した。

上記のプレート上で増殖した同株を終濃度50 μ g/mLカナマイシンと5 μ g/mLクロラムフェニコールと2%のグルコースを含んだ前記A液体培地10 mlの入った試験管に一白金耳植菌し、33 $^{\circ}$ Cにて7-15時間、好氣的に振とう培養を行った。

上記条件で増殖した各株を、終濃度50 μ g/mLカナマイシンと5 μ g/mLクロラムフェニコールと4%のグルコースを含んだ前記A液体培地10 mlに初期菌体濃度 $OD_{610} = 0.5$ となるように懸濁し、200 mgのCaCO₃を加え33 $^{\circ}$ Cにて48時間、好氣的に振とう培養を行った。48時間後の培養液を遠心分離（4 $^{\circ}$ C、15000 \times g、5分）し、得られた上清液について前記高速液体クロマトグラフィーシステムによりパラアミノ安息香酸の定量分析を行った。その結果、同株は48時間後、7.6 mMのパラアミノ安息香酸を生産した。

【0115】

[実施例6]

様々な生物由来pabABのパラアミノ安息香酸生産に対する影響

*Corynebacterium glutamicum*形質転換体によるパラアミノ安息香酸生産におけるpabAB

10

20

30

40

50

遺伝子導入の効果を調べるため、ESani 12株をベースとして構築した複数種類の株についてパラミノ安息香酸生産性を比較した。各株を終濃度50 $\mu\text{g/mL}$ カナマイシンと4%のグルコースを含んだ前記A寒天培地に塗布し、33 $^{\circ}\text{C}$ 、15時間暗所に静置した。

上記のプレート上で増殖した各株を終濃度50 $\mu\text{g/mL}$ カナマイシンと2%のグルコースを含んだ前記A液体培地10 mlの入った試験管に一白金耳植菌し、33 $^{\circ}\text{C}$ にて7-15時間、好氣的に振とう培養を行った。

上記条件で増殖した各株を、終濃度50 $\mu\text{g/mL}$ カナマイシンと4%のグルコースを含んだ前記A液体培地10 mlに初期菌体濃度 $\text{OD}_{610} = 0.5$ となるように植菌し、200 mgの CaCO_3 を加え33 $^{\circ}\text{C}$ にて48時間、好氣的に振とう培養を行った。48時間後の培養液を遠心分離 (4 \times 15000 \times g、5分) し、得られた上清液について前記高速液体クロマトグラフィーシステムによりパラミノ安息香酸の定量分析を行った。

結果を表13に示す。この結果から、コリネバクテリウム属由来のpabABの高発現によりパラミノ安息香酸の生成量は増大することが示され、特にCorynebacterium callunae由来のpabABを用いた場合特に高い生産量を示すことがわかった。

【0116】

【表13】

pabABの由来を変化させた場合のパラミノ安息香酸生産量の比較

菌株名	pabAB 遺伝子源	4-ABA 生産濃度 (mM)
ANI 137	Corynebacterium efficiens	20.3
ANI 138	Neurospora crassa	10.0
ANI 139	Corynebacterium glutamicum	10.5
ANI 140	Corynebacterium callunae	24.0
ANI 152	Corynebacterium casei	18.0
ANI 155	Rhodococcus erythropolis	0.8
ANI 156	Rhodococcus opacus	10.8
ANI 157	Corynebacterium terpenotabidum	5.6
ANI 158	Corynebacterium argentoratense	7.0
ANI 205	Corynebacterium ureicelerivorans	9.9

表13に示される通り、pabABの由来により4-ABA生産量は大きく変動した。コリネバクテリウム属由来のpabABは概ね良好な4-ABA生産量を与えた。特に、コリネバクテリウム エフィシエンス、コリネバクテリウム カルナエ、コリネバクテリウム カゼイ由来のpabABを導入した形質転換体の4-ABA生産量が高かった。

【0117】

[実施例7]

様々な生物由来pabCのパラミノ安息香酸生産に対する影響

Corynebacterium glutamicum形質転換体によるパラミノ安息香酸生産におけるpabC遺伝子導入の効果を調べるため、ESani 41株をベースとして構築した複数種類の株について実施例6と同様の方法でパラミノ安息香酸の生産性を比較した。結果を表14に示す。

【0118】

【表14】

pabC の由来を変化させた場合のパラアミノ安息香酸生産量の比較

菌株名	pabC 遺伝子源	4-ABA 生産濃度 (mM)
ANI 207	<i>Escherichia coli</i>	13.1
ANI 208	<i>Escherichia fergusonii</i>	12
ANI 209	<i>Saccharophagus degradans</i>	11.1
ANI 210	<i>Shewanella woodyi</i>	0.5
ANI 211	<i>Corynebacterium callunae</i>	3.8
ANI 212	<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i>	11.4
ANI 213	<i>Anabaena variabilis</i>	12.4
ANI 214	<i>Azotobacter vinelandii</i>	11.4
ANI 215	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	10.7
ANI 216	<i>Clostridium beijerinckii</i>	5.7
ANI 217	<i>Xenorhabdus bovienii</i>	12.7
ANI 218	<i>Bacillus pseudofirmus</i>	10.3
ANI 219	<i>Caulobacter crescentus</i>	9.7
ANI 220	<i>Synechococcus</i> sp.	9.7
ANI 221	<i>Bacteroides thraiotaomicron</i>	9.8
ANI 222	<i>Ferrimonas balearica</i>	10.1

10

20

表14に示される通り、*Escherichia*属、*Saccharophagus*属、*Arthrobacter*属、*Anabaena*属、*Ochrobactrum*属、*Xenorhabdus*属、*Bacillus*属、または*Ferrimonas*属由来のpabCの高発現によりパラアミノ安息香酸の生成量は増大した。

30

【0119】

[実施例8]

代謝経路の強化と副生経路の遮断によるパラアミノ安息香酸生産性への影響

*Corynebacterium glutamicum*形質転換体によるパラアミノ安息香酸生産における代謝経路の最適化の効果を調べるため、複数種類の株について実施例6と同様の方法でパラアミノ安息香酸生産性を比較した。

ここではシキミ酸経路上の遺伝子を染色体上に追加した場合、および、副生経路遺伝子を破壊した場合の効果を比較した。結果を表15に示す。

【0120】

【表15】

シキミ酸経路の強化、副生経路の遮断を施した各株の
パラアミノ安息香酸生産量の比較

菌株名	4-ABA 生産濃度 (mM)
ANI 140	24.0
ANI 162	24.2
ANI 166	26.3
ANI 179	36.8
ANI 186	37.5
ANI 187	37.1
ANI 192	39.5
ANI 198	40.1

10

表15に示される通り、シキミ酸経路の強化、副生経路の遮断を施すことによってパラアミノ安息香酸の生成量は増大した。

【0121】

[実施例9]

20

4-ABA生産性に与える宿主の影響 (大腸菌とコリネ型細菌)

宿主の違いによる4-ABA生産能力の違いを調べるため、コリネ型細菌と大腸菌それぞれに同じ生物種由来のpabABとpabCを導入し、4-ABA生産性を比較した。ここでpabABはCorynebacterium callunae由来のものを、pabCは大腸菌由来のものを用いた。

【0122】

コリネ型細菌の野生株をベースとして構築した生産株ANI 109 (実施例1 (表12)を終濃度50 $\mu\text{g/mL}$ カナマイシンと5 $\mu\text{g/mL}$ クロラムフェニコールと4%のグルコースを含んだ前記A寒天培地に塗布し、33 $^{\circ}\text{C}$ 、15時間暗所に静置した。上記のプレート上で増殖した各株を終濃度50 $\mu\text{g/mL}$ カナマイシンと5 $\mu\text{g/mL}$ クロラムフェニコールと2%のグルコースを含んだ前記A液体培地10 mlの入った試験管に一白金耳植菌し、33 $^{\circ}\text{C}$ にて7-15時間、好氣的に振とう培養を行った。

30

上記条件で増殖した各株を、終濃度50 $\mu\text{g/mL}$ カナマイシンと5 $\mu\text{g/mL}$ クロラムフェニコールと4%のグルコースを含んだ前記A液体培地10 mlに初期菌体濃度 $\text{OD}_{610} = 0.5$ となるように植菌し、200 mgの CaCO_3 を加え33 $^{\circ}\text{C}$ にて48時間、好氣的に振とう培養を行った。48時間後の培養液を遠心分離 (4 $^{\circ}\text{C}$, 15000 \times g, 5分) し、得られた上清液について前記高速液体クロマトグラフィーシステムによりパラアミノ安息香酸の定量分析を行った。

【0123】

大腸菌K-12 MG1655株の野生株をベースとして構築したANI 225 (実施例1 (表12)を終濃度50 $\mu\text{g/mL}$ カナマイシンと50 $\mu\text{g/mL}$ クロラムフェニコールを含んだ前記LB寒天培地に塗布し、33 $^{\circ}\text{C}$ 、15時間暗所に静置した。上記のプレート上で増殖した各株を終濃度50 $\mu\text{g/mL}$ カナマイシンと50 $\mu\text{g/mL}$ クロラムフェニコールと2%のグルコースを含んだ前記LB液体培地10 mlの入った試験管に一白金耳植菌し、37 $^{\circ}\text{C}$ にて7-15時間、好氣的に振とう培養を行った。

40

上記条件で増殖した各株を、終濃度50 $\mu\text{g/mL}$ カナマイシンと50 $\mu\text{g/mL}$ クロラムフェニコールと4%のグルコースを含んだ前記LB液体培地10 mlに初期菌体濃度 $\text{OD}_{610} = 0.5$ となるように植菌し、200 mgの CaCO_3 を加え37 $^{\circ}\text{C}$ にて48時間、好氣的に振とう培養を行った。48時間後の培養液を遠心分離 (4 $^{\circ}\text{C}$, 15000 \times g, 5分) し、得られた上清液について前記高速液体クロマトグラフィーシステムによりパラアミノ安息香酸の定量分析を行った。

【0124】

その結果、コリネ型細菌を宿主としたANI 109株の48時間後の培養上清中に含まれる4-A

50

BA濃度は16.2 mMだった。これに対して大腸菌を宿主としたANI 225株の場合は検出限界以下だった。

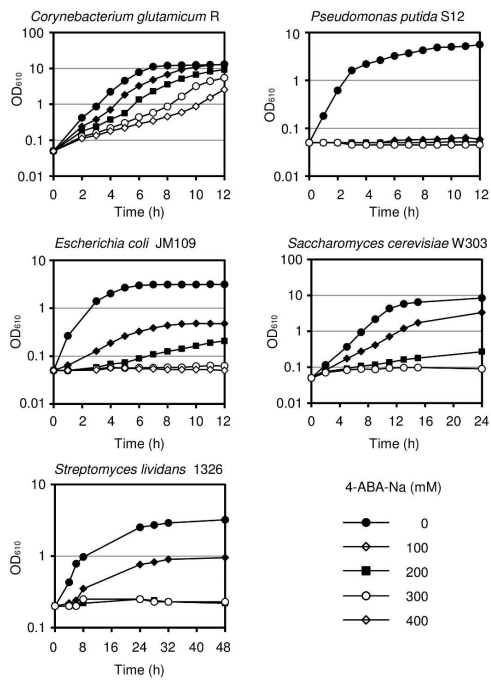
【産業上の利用可能性】

【0125】

本発明方法によれば、微生物を用いて実用的な効率でグルコース等から4-ABA又はその塩を製造することができる。

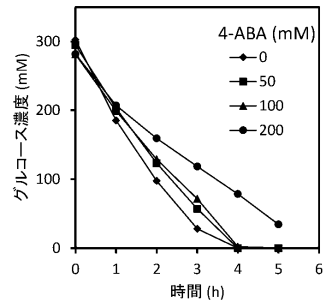
【図1】

パラアミノ安息香酸存在下での各微生物の増殖曲線



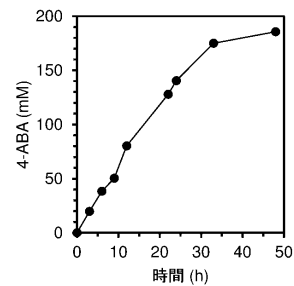
【図2】

パラアミノ安息香酸存在下での、コリネバクテリウム グルタミカム野生株の反応液中グルコース濃度の経時変化



【図3】

パラアミノ安息香酸生産の経時変化



【配列表】

0006564929000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 須田 雅子

京都府木津川市木津川台9丁目2番地 公益財団法人地球環境産業技術研究機構内

(72)発明者 久保田 健

京都府木津川市木津川台9丁目2番地 公益財団法人地球環境産業技術研究機構内

審査官 川合 理恵

(56)参考文献 特開2015-000015(JP,A)

国際公開第2013/103894(WO,A1)

国際公開第2016/027870(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

C12N 1/21

C12N 15/00-15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

PubMed