

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5940985号
(P5940985)

(45) 発行日 平成28年6月29日 (2016. 6. 29)

(24) 登録日 平成28年5月27日 (2016. 5. 27)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 N 1/21 (2006. 01)		C 1 2 N	1/21 Z N A
C 1 2 P 13/00 (2006. 01)		C 1 2 P	13/00
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)		C 1 2 N	15/00 A
C 1 2 R 1/15 (2006. 01)		C 1 2 P	13/00
		C 1 2 R	1:15

請求項の数 7 (全 25 頁)

(21) 出願番号	特願2012-550955 (P2012-550955)	(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23年12月27日 (2011. 12. 27)	(73) 特許権者	000183233 住友ゴム工業株式会社 兵庫県神戸市中央区脇浜町3丁目6番9号
(86) 国際出願番号	PCT/JP2011/080151	(74) 代理人	100077012 弁理士 岩谷 龍
(87) 国際公開番号	W02012/090978	(72) 発明者	湯川 英明 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24年7月5日 (2012. 7. 5)	(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
審査請求日	平成26年10月29日 (2014. 10. 29)		
(31) 優先権主張番号	特願2010-293972 (P2010-293972)		
(32) 優先日	平成22年12月28日 (2010. 12. 28)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		
微生物の受託番号	NPMD NITE BP-1001		

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アニリンの製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記の(a)又は(b)のDNAからなるアミノベンゾエート デカルボキシラーゼ(aminobenzoate decarboxylase)活性を有する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、アニリン生産能を有する形質転換体。

(a) 配列番号16の塩基配列からなるDNA、配列番号19の塩基配列からなるDNA、配列番号22の塩基配列からなるDNA、配列番号25の塩基配列からなるDNA、配列番号28の塩基配列からなるDNA、配列番号31の塩基配列からなるDNA、又は配列番号34の塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号16、19、22、25、28、又は31の塩基配列と90%以上の同一性を有し、かつアミノベンゾエート デカルボキシラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA

【請求項 2】

宿主のコリネ型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 に記載の形質転換体。

【請求項 3】

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 グルミカムR (FERM P - 18976)、ATCC13032、又はATCC13869である請求項 2 に記載の形質転換体。

【請求項 4】

コリネバクテリウム グルタミカム ANI-1 (受託番号: NITE BP-1001) 形質転換体。

【請求項 5】

アミノベンゾエート デカルボキシラーゼ(aminobenzoate decarboxylase)活性を有する

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、アニリン生産能を有する形質転換体を、還元条件下、アミノ安息香酸、そのエステル、及び/又はその塩を含有する反応液中で反応させる工程と、反応培地中のアニリンを回収する工程とを含むアニリンの製造方法。

【請求項 6】

反応工程において、形質転換体を実質的に増殖しない請求項 5 に記載のアニリンの製造方法。

【請求項 7】

還元条件下の反応液の酸化還元電位が - 2 0 0 ~ - 5 0 0 ミリボルトである請求項 5 又は 6 に記載のアニリンの製造方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アニリン生産技術に関する。さらに詳しくは、アニリン生産機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アニリンの製造技術に関する。

【背景技術】

【0002】

地球温暖化、及び化石資源枯渇問題を背景に、再生可能資源を原料とした化学品の製造は、バイオ燃料製造と並び、新産業バイオリファイナリーとして低炭素社会実現の重要な方策であることが認識され、大きな注目が集まっている。

20

ここで、アニリンは、染料、タイヤの加硫促進剤や老化防止剤等のゴム製品材料のような化学製品；繊維、導電性ポリマーのような機能材料；農業；医薬品などの原料として広く利用されている。

【0003】

現在、アニリンは、原油を原料として化学的に生産されている。化学的アニリン製造方法としては、ニトロベンゼンをスズまたは鉄と塩酸で還元する方法、銅、ニッケルなどの金属触媒を用いてニトロベンゼンに水素添加する還元法、高温高圧下にクロロベンゼンとアンモニアとを反応させる方法（アンモノリシス）などがあるが、いずれも溶剤類及び高熱エネルギーを必要とする、典型的な化学工業の高エネルギー消費型プロセスである。従って、地球環境保全や温室効果ガス削減の観点から、二酸化炭素排出が少ない省エネルギー型で、再生可能資源から製造でき、低廃棄物排出の環境調和型プロセスの開発、即ちバイオアニリン製造技術確立が急務となっている。

30

しかし、再生可能資源を原料としたバイオアニリン生産は、乳酸やエタノールの生産と比較して、原料となる糖類からの代謝反応段数が非常に多いために生産性が低い。また、生産物であるアニリンによる菌の増殖阻害や、アニリンによる細胞毒性等の難点がある。このため、工業的生産は不可能とされている。

【0004】

非遺伝子組換え菌によるアニリン生成技術として、具体的には、以下の方法が知られている。

40

例えば、非特許文献 1 は、マイコバクテリウム スメグマティス (*Mycobacterium smegmatis*) を培養した後、洗菌した細胞に 4-アミノ安息香酸を添加すると、微量のアニリンが生成することを開示している。しかし、非特許文献 1 の方法はアニリン生産性が実用上十分ではない。なお、非特許文献 1 は、4-アミノ安息香酸からのアニリン生成に関わる酵素、その活性、及び活性を有する酵素遺伝子には言及していない。

また、非特許文献 2 は、病原性大腸菌エシェリキア コリ (*Escherichia coli*) 0111 の洗菌した細胞、又は細胞抽出液に、アントラニル酸 (2-アミノ安息香酸)、又は 4-アミノ安息香酸を添加すると、微量のアニリンが生成することを開示している。しかし、非特許文献 2 の方法はアニリン生産性が実用上十分ではない。なお、非特許文献 2 は、アントラニル酸、又は 4-アミノ安息香酸からのアニリン生成に関わる酵素、その活性、及び活性を

50

有する酵素遺伝子には言及していない。

また、特許文献1は、ストレプトマイセス グリセウス (*Streptomyces griseus*) を、アニリン原料としてグルコースを含むTSB (Trypticase Soy Broth) 培地で、好気条件下に4~5日間培養することにより、培養液中にアニリンを生成させる技術を開示している。しかし、特許文献1には、具体的なアニリンの生産量や、生産効率などが示されておらず、特許文献1の方法の実用性については不明である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特開2008-274225号公報

10

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】The Journal of Biological Chemistry, Vol.193, 1951, 453-458.

【非特許文献2】Journal of the American Chemical Society, Vol.79, 1957, 628-630.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、アミノ安息香酸を原料として効率よくアニリンを製造できる微生物、及びアミノ安息香酸を原料として効率よくアニリンを製造できる方法を提供することを課題とする。

20

【課題を解決するための手段】

【0008】

上記課題を解決するために本発明者らは研究を重ね、コリネ型細菌にアミノベンゾエート デカルボキシラーゼ (aminobenzoate decarboxylase) 遺伝子を導入した形質転換体は、効率よくアミノ安息香酸からアニリンを生産することを見出した。また、この形質転換体は、還元条件下の反応液中で実質的に増殖しない状態で反応させる場合、特に、アニリン生産効率が高いことを見出した。

【0009】

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アニリンの製造方法を提供する。

30

項1. アミノベンゾエート デカルボキシラーゼ (aminobenzoate decarboxylase) 活性を有する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、アニリン生産能を有する形質転換体。

項2. アミノベンゾエート デカルボキシラーゼ活性を有する酵素をコードする遺伝子が、パチラス サブチリス (*Bacillus subtilis*) 由来の遺伝子、ラクトパチルス ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*) 由来の遺伝子、ラクトパチラス ブレビス (*Lactobacillus brevis*) 由来の遺伝子、シュードモナス プチダ (*Pseudomonas putida*) 由来の遺伝子、エシェリキア コリ (*Escherichia coli*) 由来の遺伝子、サッカロマイセス セレビス (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来の遺伝子、又はエンテロバクター クロアカエ (*Enterobacter cloacae*) 由来の遺伝子である項1に記載の形質転換体。

40

項3. アミノベンゾエート デカルボキシラーゼ活性を有する酵素をコードする遺伝子が下記の(a)又は(b)のDNAである項1に記載の形質転換体。

(a) 配列番号16の塩基配列からなるDNA、配列番号19の塩基配列からなるDNA、配列番号22の塩基配列からなるDNA、配列番号25の塩基配列からなるDNA、配列番号28の塩基配列からなるDNA、配列番号31の塩基配列からなるDNA、又は配列番号34の塩基配列からなるDNA

(b) (a)の何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し、かつアミノベンゾエート デカルボキシラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA

項4. 宿主のコリネ型細菌がコリネバクテリウム グルタミカムである項1~3の何れかに記載の形質転換体。

50

項 5 . 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 グルミカムR (FERM P - 18976)、ATCC13032、又はATCC13869である項 4 に記載の形質転換体。

項 6 . コリネバクテリウム グルタミカム ANI-1 (受託番号：NITE BP-1001) 形質転換体。

項 7 . 項 1 ~ 6 の何れかに記載の形質転換体を、還元条件下、アミノ安息香酸、そのエステル、及び/又はその塩を含有する反応液中で反応させる工程と、反応培地中のアニリンを回収する工程とを含むアニリンの製造方法。

項 8 . 反応工程において、形質転換体を実質的に増殖しない項 7 に記載のアニリンの製造方法。

項 9 . 還元条件下の反応液の酸化還元電位が - 2 0 0 ~ - 5 0 0 ミリボルトである項 7 又は 8 に記載のアニリンの製造方法。

10

【発明の効果】

【 0 0 1 0 】

本発明の形質転換体を用いることにより、アミノ安息香酸、その塩、又はそのエステルからアニリンを高効率で製造することができる。

一般に微生物はアニリンのような溶剤の細胞毒性により生育が阻害されるため、微生物を用いてアニリンを製造することは困難であったが、本発明方法によれば、微生物を用いて、実用上十分に効率良くアニリンを製造することができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 1 】

20

【図 1】実施例で用いたプラスミドの構成を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 2 】

以下、本発明を詳細に説明する。

(I) アニリン生産能を有する形質転換体

本発明のアニリン生産能を有する形質転換体は、アミノベンゾエート デカルボキシラーゼ活性を有する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形質転換体である。

【 0 0 1 3 】

宿主

30

コリネ型細菌とは、バージェズ・マニユアル・デターミネイティブ・バクテリオロジー [Bergeys 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。

【 0 0 1 4 】

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。

40

中でも、安全でかつアニリン生産性が高い点で、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 P-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-233AB-41 (FERM BP-1498) 等が挙げられる。中でも、R株 (FERM P-18976)、ATCC13032株、ATCC13869株が好ましい。

【 0 0 1 5 】

50

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)]。

10

旧分類のブレビバクテリウム ラクトファーメンタム ATCC13869株、ブレビバクテリウム フラバムの MJ-233株 (FERM BP-1497)、MJ-233AB-41株 (FERM BP-1498) なども好適なコリネバクテリウム グルタミカムである。

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。

【0016】

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。

20

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。

【0017】

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。このような遺伝子破壊株を宿主として用いることにより、アニリンの生産性を向上させたり、副生成物の生成を抑制したりすることができる。

30

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 P-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、W02005/010182A1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。

40

コリネ型細菌は、他細菌に比べて、アニリンのような溶剤に対する耐性が高い。また、コリネ型細菌は、他の好気性細菌に比べて、実質的に増殖しない還元条件下で効率よく物質生産を行える。これらの点で、コリネ型細菌は本発明方法によるアニリン製造に好適である。

【0018】

アミノベンゾエート デカルボキシラーゼ酵素遺伝子

アミノベンゾエート デカルボキシラーゼは、アミノ安息香酸から炭酸を脱離させてアニリンを生成する反応、及びその逆反応を触媒する酵素である。

アミノベンゾエート デカルボキシラーゼ活性を有する酵素をコードする遺伝子の由来は特に限定されないが、パチラス サブチリス (*Bacillus subtilis*) 由来の遺伝子、ラク

50

トバチルス ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*) 由来の遺伝子、ラクトバチラス プレビス (*Lactobacillus brevis*) 由来の遺伝子、シュードモナス プチダ (*Pseudomonas putida*) 由来の遺伝子、エシェリキア コリ (*Escherichia coli*) 由来の遺伝子、サッカロマイセス セレビスイエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来の遺伝子、又はエンテロバクター クロアカエ (*Enterobacter cloacae*) 由来の遺伝子が好ましい。中でも、バチラス サブチリス由来の遺伝子、及びエンテロバクター クロアカエ由来の遺伝子が好ましい。特に、アントラニル酸 (2-アミノ安息香酸) を基質とした場合はバチラス サブチリス由来の遺伝子が好ましく、4-アミノ安息香酸を基質とした場合はエンテロバクター クロアカエ由来の遺伝子が好ましい。

【0019】

10

バチラス サブチリス由来の遺伝子としては配列番号16の塩基配列からなるDNAが挙げられ、ラクトバチルス ラムノーサス由来の遺伝子としては配列番号19の塩基配列からなるDNAが挙げられ、ラクトバチラス プレビス由来の遺伝子としては配列番号22の塩基配列からなるDNAが挙げられ、シュードモナス プチダ由来の遺伝子としては配列番号25の塩基配列からなるDNAが挙げられ、エシェリキア コリ由来の遺伝子としては配列番号28の塩基配列からなるDNAが挙げられ、サッカロマイセス セレビスイエ由来の遺伝子としては配列番号31の塩基配列からなるDNAが挙げられ、エンテロバクター クロアカエ由来の遺伝子としては配列番号34の塩基配列からなるDNAが挙げられる。

【0020】

また、本発明では、配列番号16、19、22、25、28、31、又は34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し、かつアミノベンゾエート デカルボキシ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

本発明において「ストリンジェントな条件」は、一般的な条件、例えば、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, 1989, Vol2, p11.45に記載された条件を指す。具体的には、完全ハイブリッドの融解温度(T_m)より5~10 低い温度でハイブリダイゼーションが起こる場合を指す。

【0021】

アミノベンゾエート デカルボキシラーゼ活性は、J. Am. Chem. Soc., 79, 628-630 (1957)に記載の方法を改変して測定できる。簡単に説明すると、コリネ型細菌を栄養培地で、18時間33 で培養したものを、最少培地で2回洗菌した後、最少培地に再懸濁、Intact Cellとする。次に反応として、Intact Cell にHEPES(pH7.0)を緩衝液として25mM加え、基質としてアントラニル酸、又は4-アミノベンゾエートを終濃度5mMになるように添加する。33、200rpmで6時間振とう後、反応液を菌と上清に遠心分離し、上清を0.22 μ mのフィルターで濾過したものをサンプルとする。生じたアニリン生成量をGC/MS、又はHPLCで定量できる。

30

また、本発明では、配列番号16、19、22、25、28、31、又は34の塩基配列と同一性が90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上の塩基配列からなり、かつアミノベンゾエート デカルボキシ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。

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。

40

【0022】

配列番号16、19、22、25、28、31、又は34の塩基配列からなるDNAのホモログは、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、これにより高確率でアミノベンゾエート デカルボキシラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAが得られる。

【0023】

形質転換のためのベクターの構築

PCRで増幅したアミノベンゾエート デカルボキシラーゼ酵素をコードするDNAは、それ

50

ぞれ、宿主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。

プラスミドベクターとしては、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、ブレビバクテリウム ラクトファーメンタム (*Brevibacterium lactofermentum*) 2256由来のpAM330〔特開昭58-67699〕、〔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)〕、コリネバクテリウム グルタミカム ATCC13058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〕、〔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)〕などが挙げられる。

10

【0024】

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などが挙げられ、中でも、PgapAが好ましい。

20

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、ブレビバクテリウム ラクトファーメンタム (*Brevibacterium lactofermentum*) のtrpターミネーターなどが挙げられ、中でも、rrnB T1T2ターミネーターが好ましい。

【0025】

形質転換

形質転換方法は、公知の方法を制限無く使用できる。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、電気穿孔法などが挙げられる。中でも、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〔Kurusu, Y. et al., Electroporation-transformation system for Coryneform bacteria by auxotrophic complementation. Agric. Biol. Chem. 54:443-447 (1990)〕及び〔Vertes A.A. et al., Presence of mrr- and mcr-like restriction systems in Coryneform bacteria. Res. Microbiol. 144:181-185 (1993)〕により行うことができる。

30

【0026】

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有する天然培地又は合成培地等を用いることができる。

40

炭素源としては、グルコース、フルクトース、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、澱粉、糖蜜、ソルビトール、グリセリン等の糖質又は糖アルコール；酢酸、クエン酸、乳酸、フマル酸、マレイン酸又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等が挙げられる。また、所望によりノルマルパラフィン等の炭化水素等も用いることができる。炭素源は、1種を単独で使用でき、又は2種以上を混合して使用してもよい。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。

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、

50

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、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、約0.1~10 (w/v%)とすればよい。

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、又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が、通常、約0.01~1 (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、コーンステープリカー、脱脂粉乳、脱脂大豆塩酸加水分解物、又は動植物若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。栄養物質の培地濃度は、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、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5~8が好ましい。

【0027】

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日間とすればよい。

【0028】

(II) アニリンの製造方法

上記説明した本発明の形質転換体を、アミノ安息香酸、その塩、及び/又はそのエステルを含有する反応液中で反応させる工程と、反応液中のアニリンを回収する工程とを含む方法によりアニリンを製造することができる。

微生物の増殖

反応に先立ち、形質転換体を好気条件下で、温度約25~35 で、約12~48時間培養して増殖させることが好ましい。

【0029】

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。

【0030】

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

10

20

30

40

50

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。

【0031】

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6~8が好ましい。

【0032】

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。

【0033】

反応液

反応液は、アニリン前駆体(アニリン原料)を含有する水、緩衝液、無機塩培地などを用いることができる。

前駆体としては、アミノ安息香酸、その塩、及び/又はそのエステルを用いることができる。アミノ安息香酸としては、2-アミノ安息香酸(o-アミノ安息香酸;アントラニル酸)、3-アミノ安息香酸(m-アミノ安息香酸)、4-アミノ安息香酸(p-アミノ安息香酸)の何れも使用できる。中でも、水溶性であるため反応に使用し易い点で、2-アミノ安息香酸、4-アミノ安息香酸が好ましい。

塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、塩酸塩などが挙げられる。また、エステルとしては、炭素数1~4のアルコールとのエステルなどが挙げられる。

反応液への溶解度が高くなる点で、塩が好ましい。前駆体は、1種を単独で、又は2種以上を混合して使用できる。

反応液中のアミノ安息香酸、その塩、及び/又はそのエステルの濃度は、約0.1~10 (w/v%) が好ましく、約0.5~7 (w/v%) がより好ましく、約0.5~5 (w/v%) がさらに好ましい。上記範囲であれば、効率良く、アニリンを製造できる。

緩衝液としては、リン酸バッファー、トリスバッファー、炭酸バッファーなどが挙げられる。緩衝液の濃度は、約10~150 mMが好ましい。

無機塩培地としては、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、炭酸カルシウム等の無機塩の1種又は2種以上を含む培地が挙げられる。中でも、硫酸マグネシウムを含む培地が好ましい。無機塩培地として、具体的には、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。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。

10

20

30

40

50

反応液のpHは約6~8が好ましい。反応中は、アンモニア水溶液、水酸化ナトリウム水溶液などを用いて、pHコントローラー（例えば、エイプル株式会社製、型式：DT-1023）で、反応液のpHを中性付近、特に約7にコントロールしながら反応させることが好ましい。

反応条件

反応温度、即ち反応中の形質転換体の生存温度は、約20~40 が好ましく、約25~35 がより好ましい。上記温度範囲であれば、効率良くアニリンを製造できる。

また、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。

【0034】

<還元条件>

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が、還元条件で行うことが好ましい。還元条件では、コリネ型細菌は実質的に増殖せず、一層効率的にアニリンを生産させることができる。

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 - 250 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。

【0035】

還元条件にある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、反応液調製用の液体媒体として、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ある。

【0036】

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。

【0037】

アニリンの回収

上記のようにして培養することにより、反応液中にアニリンが生産される。反応液を回収することによりアニリンを回収できるが、さらに、公知の方法でアニリンを反応液から

10

20

30

40

50

分離することもできる。そのような公知の方法として、蒸留法、膜透過法、有機溶媒抽出法等が挙げられる。

【実施例】

【0038】

以下、本発明を実施例により詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例1 アニリン生産遺伝子のクローニングと発現

(1) 微生物からの染色体DNAの抽出

パチルス サブチリス (*Bacillus subtilis*) NBRC 14144からの染色体DNA抽出は、NBRC Medium No.802培地 [polypeptone 10 g, yeast extract 2 g, MgSO₄ · 7H₂O 1 gを蒸留水1 Lに溶解] に、白金耳を用いて植菌後、対数増殖期まで37 で振盪培養し、菌体を集菌後、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、取扱説明書に従い、集めた菌体から染色体DNAを回収した。

10

【0039】

ラクトバチルス ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*) NBRC 3425からの染色体DNA抽出は、NBRC Medium No.804培地 [polypeptone 5 g, yeast extract 5 g, glucose 5 g, MgSO₄ · 7H₂O 1 gを蒸留水1 Lに溶解] に、白金耳を用いて植菌後、対数増殖期まで30 で振盪培養し、菌体を集菌後、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、取扱説明書に従い、集めた菌体から染色体DNAを回収した。

20

【0040】

ラクトバチラス ブレビス (*Lactobacillus brevis*) ATCC 367からの染色体DNA抽出は、Lactobacilli MRS broth (ベクトン・ディッキンソン社製 BD 288130) に、白金耳を用いて植菌後、対数増殖期まで30 で振盪培養し、菌体を集菌後、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、取扱説明書に従い、集めた菌体から染色体DNAを回収した。

【0041】

シュードモナス プチダ (*Pseudomonas putida* KT2440) ATCC 47054からの染色体DNA抽出は、LB培地 [tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 5 gを蒸留水1 Lに溶解] に、白金耳を用いて植菌後、対数増殖期まで37 で振盪培養し、菌体を集菌後、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、取扱説明書に従い、集めた菌体から染色体DNAを回収した。

30

【0042】

エシェリキア コリ (*Escherichia coli* K-12 MG1655) からの染色体DNA抽出は、LB培地 [tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 5 gを蒸留水1 Lに溶解] に、白金耳を用いて植菌後、対数増殖期まで37 で振盪培養し、菌体を集菌後、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、取扱説明書に従い、集めた菌体から染色体DNAを回収した。

【0043】

サッカロマイセス セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) NBRC 10217からの染色体DNA抽出は、NBRC Medium No.108培地 [glucose 10 g, peptone 5 g, yeast extract 3 g, malt extract 3 gを蒸留水1 Lに溶解] に、白金耳を用いて植菌後、対数増殖期まで24 で振盪培養し、菌体を集菌後、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、取扱説明書に従い、集めた菌体から染色体DNAを回収した。

40

【0044】

エンテロバクター クロアカエ (*Enterobacter cloacae*) NBRC 13535からの染色体DNA抽出は、NBRC Medium No.802培地 [polypeptone 10 g, yeast extract 2 g, MgSO₄ · 7H₂O 1 gを蒸留水1 Lに溶解] に、白金耳を用いて植菌後、対数増殖期まで37 で振盪培養し、菌体を集菌後、DNAゲノム抽出キット(商品名: GenomicPrep Cells and Tissue DNA Isola

50

tion Kit、アマシャム社製)を用いて、取扱説明書に従い、集めた菌体から染色体DNAを回収した。

【 0 0 4 5 】

(2) クローニングベクターの構築

クローニングベクター-pCRB22の構築

コリネバクテリウム カゼイ JCM12072由来のプラスミドpCASE1のDNA複製起点(以降、pCASE1-oriと記す)配列、及びクローニングベクター-pHSG298(タカラバイオ株式会社製)をそれぞれ含むDNA断片を以下のPCR法により増幅した。

PCRに際して、pCASE1-ori配列、クローニングベクター-pHSG298をそれぞれクローン化するべく、配列番号1(pCASE1-ori配列)、配列番号2(クローニングベクター-pHSG298)を基に、それぞれ下記の一対のプライマーを合成し、使用した。

10

【 0 0 4 6 】

pCASE1-ori配列増幅用プライマー

(a-1); 5' - AT AGATCT AGAACGTCCGTAGGAGC -3' (配列番号3)

(b-1); 5' - AT AGATCT GACTTGGTTACGATGGAC -3' (配列番号4)

尚、プライマー(a-1)及び(b-1)には、BglIII制限酵素部位が付加されている。

クローニングベクター-pHSG298増幅用プライマー

(a-2); 5' - AT AGATCT AGTTTTCCCGACTGGAAAG -3' (配列番号5)

(b-2); 5' - AT AGATCT CGTGCCAGCTGCATTAATGA -3' (配列番号6)

尚、プライマー(a-2)及び(b-2)には、BglIII制限酵素部位が付加されている。

20

【 0 0 4 7 】

鋳型DNAは、Japan. Collection of Microorganisms (JCM)より入手したコリネバクテリウム カゼイ JCM12072から抽出したトータルDNA及びクローニングベクター-pHSG298(タカラバイオ株式会社製)を用いた。

実際のPCRは、サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700(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TaKaRa LA Taq(タカラバイオ株式会社製)を用いて下記の条件で行った。

【 0 0 4 8 】

反応液:

TaKaRa LA Taq™ (5 units/μl)	0.5 μl
10X LA PCR™ Buffer II (Mg ²⁺ free)	5 μl
25mM MgCl ₂	5 μl
dNTP Mixture (2.5mM each)	8 μl
鋳型 DNA	5 μl (DNA 含有量 1 μg 以下)
上記記載の 2 種プライマー*	各々0.5 μl (最終濃度 1 μM)
滅菌蒸留水	25.5 μl

30

以上を混合し、この 50 μl の反応液を PCR にかけた。

40

*) pCASE1-ori 配列を増幅する場合はプライマー (a-1) と (b-1) の組み合わせ、クローニングベクター-pHSG298 を増幅する場合はプライマー (a-2) と (b-2) の組み合わせで行った。

【 0 0 4 9 】

PCR サイクル :

デナチュレーション過程	: 94°C	60 秒
アニーリング過程	: 52°C	60 秒
エクステンション過程	: 72°C	

pCASE1-ori 配列 150 秒

クローニングベクター-pHSG298 180 秒

以上を1サイクルとし、30サイクル行った。

10

上記で生成した反応液10 µlを0.8%アガロースゲルにより電気泳動を行い、pCASE1-ori配列の場合約1.4-kb、クローニングベクター-pHSG298の場合、約2.7-kbのDNA断片が検出できた。

【0050】

上記のPCRにより増幅したコリネバクテリウム カゼイ株由来のプラスミドpCASE1-ori配列含む約1.4-kb DNA断片10 µl及びクローニングベクター-pHSG298を含む約2.7-kb DNA断片10 µlを各々制限酵素BglIIで切断し、70 °Cで10分処理させることにより制限酵素を失活させた後、両者を混合し、これにT4 DNAリガーゼ10×緩衝液 1 µl、T4 DNAリガーゼ (タカラバイオ株式会社製) 1 unitの各成分を添加し、滅菌蒸留水で10 µlにして、15 °Cで3時間反応させ、結合させた。これをライゲーションA液とした。

20

得られたライゲーションA液を、塩化カルシウム法 [Journal of Molecular Biology, 53, 159 (1970)] によりエシェリヒア コリJM109を形質転換し、カナマイシン50 µg/mlを含む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、および1.5% 寒天] に塗布した。

培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出、該プラスミドを制限酵素BglIIでそれぞれ切断し、挿入断片を確認した。この結果、クローニングベクター-pHSG298約2.7-kbのDNA断片に加え、pCASE-ori配列の約1.4-kb DNA断片が認められた。

pCASE1-ori配列を含むクローニングベクターをpCRB22と命名した。

【0051】

30

クローニングベクター-pCRB207の構築

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リン酸デヒドロゲナーゼ (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) をコードするgapA遺伝子のプロモーター配列 (以降、PgapAと記す) を含むDNA断片、及びクローニングベクター-pKK223-3 (ファルマシア社製) 由来rrnBT1T2双方向ターミネーター配列 (以降、ターミネーター配列と記す) を含むDNA断片を以下の方法により増幅した。

PCRに際して、PgapA配列及びターミネーター配列をそれぞれクローン化するべく、配列番号7 (PgapA配列)、配列番号8 (ターミネーター配列) を基に、それぞれ下記の一対のプライマーを合成し、使用した。

【0052】

40

PgapA配列増幅用プライマー

(a-3) ; 5' - CTCT GTCGAC CCGAAGATCTGAAGATTCCTG -3' (配列番号9)

(b-3) ; 5' - CTCT GTCGAC GGATCC CCATGG TGTGTCTCCTCTAAAGATTGTAGG -3'

(配列番号10)

尚、プライマー (a-3) には、SalI制限酵素部位が、プライマー (b-3) には、SalI、BamHI及びNcoI制限酵素部位が付加されている。

ターミネーター配列増幅用プライマー

(a-4) ; 5' - CTCT GCATGC CCATGG CTGTTTTGGCGGATGAGAGA -3'

(配列番号11)

50

(b-4) ; 5' - CTCT GCATGC TCATGA AAGAGTTTGTAGAAACGCAAAAAGG -3

(配列番号12)

尚、プライマー (a-4) には、SphI 及び NcoI 制限酵素部位が、プライマー (b-4) には、SphI 及び BspHI 制限酵素部位が付加されている。

【0053】

鋳型DNAは、コリネバクテリウム グルタミカム R (FERM P-18976) から抽出した染色体DNA及びpKK223-3プラスミド (ファルマシア社製) を用いた。

実際のPCRは、サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700 (アプライド・バイオシステムズ社製) を使い、反応試薬として TaKaRa LA Taq (タカラバイオ株式会社製) を用いて下記の条件で行った。

【0054】

反応液:

TaKaRa LA Taq™ (5 units/μl)	0.5 μl	
10X LA PCR™ Buffer II (Mg ²⁺ free)	5 μl	
25mM MgCl ₂	5 μl	
dNTP Mixture (2.5mM each)	8 μl	
鋳型 DNA	5 μl	(DNA 含有量 1 μg 以下)
上記記載の2種プライマー*)	各々0.5 μl	(最終濃度 1 μM)
滅菌蒸留水	25.5 μl	

以上を混合し、この50 μl の反応液をPCRにかけた。

*) PgapA 配列を増幅する場合はプライマー(a-7)と(b-7)の組み合わせ、ターミネーター配列を増幅する場合はプライマー(a-8)と(b-8)の組み合わせで行った。

【0055】

PCR サイクル:

デナチュレーション過程	: 94°C	60 秒
アニーリング過程	: 52°C	60 秒
エクステンション過程	: 72°C	
	PgapA 配列	45 秒
	ターミネーター配列	30 秒

以上を1サイクルとし、30サイクル行った。

上記で生成した反応液10 μlを0.8%アガロースゲルにより電気泳動を行い、PgapA配列の場合約0.6-kb、ターミネーター配列の場合、約0.4-kbのDNA断片が検出できた。

【0056】

上記のPCRにより増幅したコリネバクテリウム グルタミカム R由来PgapA配列を含む約0.6-kb DNA断片10 μlとクローニングベクターpCRB22約4.1-kbを各々制限酵素SalIで切断し、70 °Cで10分処理させることにより制限酵素を失活させた後、両者を混合し、これにT4 DNAリガーゼ10×緩衝液1 μl、T4 DNAリガーゼ (タカラバイオ株式会社製) 1 unitの各成分を添加し、滅菌蒸留水で10 μlにして、15 °Cで3時間反応させ、結合させた。これをライゲーションB液とした。

得られたライゲーションB液を、塩化カルシウム法 [Journal of Molecular Biology, 53, 159 (1970)] によりエシェリヒア コリJM109を形質転換し、カナマイシン50 μg/mlを含む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、および1.5% 寒天] に塗布した。

培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出、該プラス

10

20

30

40

50

ミドを制限酵素SalIでそれぞれ切断し、挿入断片を確認した。この結果、クローニングベクター-pCRB22約4.1-kbのDNA断片に加え、PgapA配列)の約0.6-kb DNA断片が認められた。

PgapA配列を含むクローニングベクターをpCRB206と命名した。

【 0 0 5 7 】

上記PCRにより増幅したpKK223-3プラスミド由来ターミネーター配列を含む約0.4-kb DNA断片10 µlを制限酵素NcoI及びBspHIで、上述のクローニングベクター-pCRB206 2 µlを制限酵素NcoIで切断し、70 °Cで10分処理させることにより制限酵素を失活させた後、両者を混合し、これにT4 DNAリガーゼ10×緩衝液 1 µl、T4 DNAリガーゼ (タカラバイオ株式会社製) 1 unitの各成分を添加し、滅菌蒸留水で10 µlにして、15 °Cで3時間反応させ、結合させた。これをライゲーションC液とした。

得られたライゲーションC液を、塩化カルシウム法 [Journal of Molecular Biology, 53, 159 (1970)] によりエシェリヒア コリJM109を形質転換し、カナマイシン50 µg/mlを含む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、および1.5% 寒天] に塗布した。

培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出、該プラスミドを制限酵素で切断し、挿入断片を確認した。この結果、クローニングベクター-pCRB206約4.7-kbのDNA断片に加え、ターミネーター配列の約0.4-kb DNA断片が認められた。

rrnBT1T2ターミネーター配列を含むクローニングベクターをpCRB207と命名した。

【 0 0 5 8 】

クローニングベクター-pCRB209の構築

コリネバクテリウム グルタミカムR由来のgapA (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A) 遺伝子のプロモーター (以降、PgapAと記す) 配列を含むDNA断片を以下の方法により増幅した。

PCRに際して、pCRB207配列をクローン化するべく、配列番号13 (pCRB207) を基に、それぞれ下記の一対のプライマーを合成し、使用した。

【 0 0 5 9 】

pCRB207配列増幅用プライマー

(a-5) ; 5' - CTCT CATATG CTGTTTTGGCGGATGAGAG -3' (配列番号14)

(b-5) ; 5' - CTCT CATATG GTGTCTCCTCTAAAGATTGTAGG -3' (配列番号15)

尚、プライマー (a-5) 及び (b-5) にはNdeI制限酵素部位が付加されている。

鋳型DNAは、gapAプロモーター及びrrnBT1T2ターミネーター配列を含有するクローニングベクター-pCRB207を用いた。

実際のPCRは、サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700(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TaKaRa LA Taq (宝酒造株式会社製)を用いて下記の条件で行った。

【 0 0 6 0 】

10

20

30

反応液：

TaKaRa LA Taq™ (5 units/μl)	0.5 μl	
10X LA PCR™ Buffer II (Mg ²⁺ free)	5 μl	
25mM MgCl ₂	5 μl	
dNTP Mixture (2.5mM each)	8 μl	
鋳型 DNA	5 μl	(DNA 含有量 1 μg 以下)
上記記載の 2 種プライマー*	各々0.5 μl	(最終濃度 1 μM)
滅菌蒸留水	25.5 μl	

10

以上を混合し、この 50 μl の反応液を PCR にかけて。

*) pCRB207 配列を増幅する場合はプライマー(a-9)と(b-9)の組み合わせで行った。

【 0 0 6 1 】

PCR サイクル：

デナチュレーション過程	: 94°C	60 秒	
アニーリング過程	: 52°C	60 秒	
エクステンション過程	: 72°C	307 秒	20

以上を 1 サイクルとし、30 サイクル行った。

上記で生成した反応液 10 μl を 0.8% アガロースゲルにより電気泳動を行い、クローニングベクター pCRB207 配列を含む約 5.1-kb の DNA 断片が検出できた。

【 0 0 6 2 】

上記の PCR により増幅した pCRB207 由来遺伝子を含む約 5.1-kb DNA 断片 10 μl を制限酵素 NdeI で切断し、70 °C で 10 分処理させることにより制限酵素を失活させた後、これに T4 DNA リガーゼ 10 × 緩衝液 1 μl、T4 DNA リガーゼ (宝酒造株式会社製) 1 unit の各成分を添加し、滅菌蒸留水で 10 μl にして、15 °C で 3 時間反応させ、結合させた。これをライゲーション D 液とした。

30

得られたライゲーション D 液を、塩化カルシウム法 [Journal of Molecular Biology, 53, 159 (1970)] によりエシェリヒア コリ JM109 を形質転換し、カナマイシン 50 μg/ml を含む 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、および 1.5% 寒天] に塗布した。

この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミド DNA を抽出、該プラスミドを制限酵素 NdeI で切断し、制限酵素サイトの挿入を確認した。

PgapA 配列及び rrrnBT1T2 ターミネーター配列を含むクローニングベクター - を pCRB209 と命名した。

【 0 0 6 3 】

(3) アニリン生産遺伝子のクローニング

40

バチラス サブチリス由来のアニリン生産遺伝子のクローニング

バチラス サブチリス由来のアミノベンゾエート デカルボキシラーゼをコードする bsdB CD (以降、dec/BS と記載) 遺伝子を含む DNA 断片を以下の PCR 法により増幅した。

PCR に際して、dec/BS 遺伝子をクローン化するべく、配列番号 16 (バチラス サブチリス dec/BS 遺伝子) を基に、それぞれ下記の一対のプライマーを、アプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) 社製「394 DNA/RNA シンセサイザー (synthesizer)」を用いて合成し、使用した。

【 0 0 6 4 】

dec/BS 遺伝子増幅用プライマー

(a-6) ; 5' - CTCT CATATG AAAGCAGAATTCAAGCGTAAAG -3' (配列番号 17)

50

(b-6) ; 5' - CTCT CATATG GATCAAGCCTTTCGTTCCG -3' (配列番号18)

尚、プライマー (a-6) 及び (b-6) には、NdeI制限酵素部位が付加されている。

【0065】

ラクトバチルス ラムノーサス由来のアニリン生産遺伝子のクローニング

ラクトバチルス ラムノーサス由来のアミノベンゾエート デカルボキシラーゼをコードするubiDX (以降、dec/LRと記載) 遺伝子を含むDNA断片を以下のPCR法により増幅した。

PCRに際して、dec/LR遺伝子をクローン化するべく、配列番号19 (ラクトバチルス ラムノーサスdec/LR遺伝子) を基に、それぞれ下記の一対のプライマーを、アプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) 社製「394 DNA/RNAシンセサイザー (synthesizer)」を用いて合成し、使用した。

【0066】

dec/LR遺伝子増幅用プライマー

(a-7) ; 5' - CTCT CATATG ACAGCATCACCTTGGG -3' (配列番号20)

(b-7) ; 5' - CTCT CATATG TCATCTTAACGACGCTCCATTC -3' (配列番号21)

尚、プライマー (a-7) 及び (b-7) には、NdeI制限酵素部位が付加されている。

【0067】

ラクトバチルス プレビス由来のアニリン生産遺伝子のクローニング

ラクトバチルス プレビス由来のアミノベンゾエート デカルボキシラーゼをコードするLVIS_1987-LVIS_1986 (以降、dec/LBと記載) 遺伝子を含むDNA断片を以下のPCR法により増幅した。

PCRに際して、dec/LB遺伝子をクローン化するべく、配列番号22 (ラクトバチルス プレビスdec/LB遺伝子) を基に、それぞれ下記の一対のプライマーを、アプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) 社製「394 DNA/RNAシンセサイザー (synthesizer)」を用いて合成し、使用した。

【0068】

dec/LB遺伝子増幅用プライマー

(a-8) ; 5' - CTCT CATATG GTAAATGATCCTTATGATTTACGAAAAG -3'

(配列番号23)

(b-8) ; 5' - CTCT CATATG CTAATCTCCCTCCCAACG -3' (配列番号24)

尚、プライマー (a-8) 及び (b-8) には、NdeI制限酵素部位が付加されている。

【0069】

シュードモナス プチダ由来のアニリン生産遺伝子のクローニング

シュードモナス プチダ由来のアミノベンゾエート デカルボキシラーゼをコードするubiD (以降、dec/PPと記載) 遺伝子を含むDNA断片を以下のPCR法により増幅した。

PCRに際して、dec/PP遺伝子をクローン化するべく、配列番号25 (シュードモナス プチダdec/PP遺伝子) を基に、それぞれ下記の一対のプライマーを、アプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) 社製「394 DNA/RNAシンセサイザー (synthesizer)」を用いて合成し、使用した。

【0070】

dec/PP遺伝子増幅用プライマー

(a-9) ; 5' - CTCT CATATG AACGGGCCGGAAC -3' (配列番号26)

(b-9) ; 5' - CTCT CATATG TCAATCATCCACCCGAAG -3' (配列番号27)

尚、プライマー (a-9) 及び (b-9) には、NdeI制限酵素部位が付加されている。

【0071】

エシェリキア コリ由来のアニリン生産遺伝子のクローニング

エシェリキア コリ由来のアミノベンゾエート デカルボキシラーゼをコードするpurEK (以降、dec/ECと記載) 遺伝子を含むDNA断片を以下のPCR法により増幅した。

PCRに際して、dec/EC遺伝子をクローン化するべく、配列番号28 (エシェリキア コリdec/EC遺伝子) を基に、それぞれ下記の一対のプライマーを、アプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) 社製「394 DNA/RNAシンセサイザー (synthesizer)」を用い

10

20

30

40

50

て合成し、使用した。

【 0 0 7 2 】

dec/EC遺伝子増幅用プライマー

(a-10) ; 5' - CTCT CATATG TCTTCCCGCAATAATCCG -3' (配列番号29)

(b-10) ; 5' - CTCT CATATG TTAACCGAACTTACTCTGCGC -3' (配列番号30)

尚、プライマー (a-10) 及び (b-10) には、NdeI制限酵素部位が付加されている。

【 0 0 7 3 】

サッカロマイセス セレビシエ由来のアニリン生産遺伝子のクローニング

サッカロマイセス セレビシエ由来のアミノベンゾエート デカルボキシラーゼをコードするADE2 (以降、dec/SCと記載) 遺伝子を含むDNA断片を以下のPCR法により増幅した。 10

PCRに際して、dec/SC遺伝子をクローン化するべく、配列番号31 (サッカロマイセスセレビシエdec/SC遺伝子) を基に、それぞれ下記の一対のプライマーを、アプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) 社製「394 DNA/RNAシンセサイザー (synthesizer)」を用いて合成し、使用した。

【 0 0 7 4 】

dec/SC遺伝子増幅用プライマー

(a-11) ; 5' - CTCT CCATGG ATTCTAGAACAGTTGGTATATTAG -3' (配列番号32)

(b-11) ; 5' - CTCT CCATGG TTAAGCTTCGTAAC -3'

(配列番号33)

尚、プライマー (a-11) 及び (b-11) には、NcoI制限酵素部位が付加されている。 20

【 0 0 7 5 】

エンテロバクター クロアカエ由来のアニリン生産遺伝子のクローニング

エンテロバクター クロアカエ由来のアミノベンゾエート デカルボキシラーゼをコードするECL_04083-ECL_04082-ECL_04081 (以降、dec/ECLと記載) 遺伝子を含むDNA断片を以下のPCR法により増幅した。

PCRに際して、dec/ECL遺伝子をクローン化するべく、配列番号34 (エンテロバクタークロアカエdec/ECL遺伝子) を基に、それぞれ下記の一対のプライマーを、アプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) 社製「394 DNA/RNAシンセサイザー (synthesizer)」を用いて合成し、使用した。 30

dec/ECL遺伝子増幅用プライマー

(a-12) ; 5' - CTCT CATATG AGATTGATCGTGGGAATGAC -3' (配列番号35)

(b-12) ; 5' - CTCT CATATG TTACAGCAATGGCGGAATGG -3' (配列番号36)

尚、プライマー (a-12) 及び (b-12) には、NdeI制限酵素部位が付加されている。

【 0 0 7 6 】

鋳型DNAは、バチラス サブチリスは、NITE Biological Resource Center (NBRC) より入手したバチルス サブチリス NBRC 14144から抽出した染色体DNAを用いた。ラクトバチルス ラムノーサスは、NITE Biological Resource Center (NBRC) より入手したラクトバチルス ラムノーサス NBRC 3425から抽出した染色体DNAを用いた。ラクトバチルス プレピスは、American Type Culture Collection (ATCC)より入手したラクトバチラス プレピス ATCC 367から抽出した染色体DNAを用いた。シュードモナス プチダは、American Type Culture Collection (ATCC) より入手したシュードモナス プチダ ATCC 47054から抽出した染色体DNAを用いた。エシェリキア コリは、エシェリキア コリ K-12 MG1655から抽出した染色体DNAを用いた。サッカロマイセス セレビシエは、NITE Biological Resource Center (NBRC) より入手したサッカロマイセス セレビシエ NBRC 10217から抽出した染色体DNAを用いた。エンテロバクター クロアカエは、NITE Biological Resource Center (NBRC) より入手したエンテロバクター クロアカエ NBRC 13535から抽出した染色体DNAを用いた。 40

【 0 0 7 7 】

実際のPCRは、サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700(アプライド・バイオシ 50

ステムズ社製)を用い、反応試薬としてTaKaRa LA Taq (タカラバイオ株式会社製)を用いて下記の条件で行った。

反応液：

TaKaRa LA Taq™ (5 units/μl)	0.5 μl
10X LA PCR™ Buffer II (Mg ²⁺ free)	5 μl
25mM MgCl ₂	5 μl
dNTP Mixture (2.5mM each)	8 μl
鋳型 DNA	5 μl (DNA 含有量 1 μg 以下)
上記記載の 2 種プライマー [*])	各々 0.5 μl (最終濃度 1 μM)
滅菌蒸留水	25.5 μl

10

以上を混合し、この 50 μl の反応液を PCR にかけて。

*) バチラス サブチリス dec/BS 遺伝子を増幅する場合はプライマー (a-6) と (b-6) の組み合わせ、ラクトバチルス ラムノーサス dec/LR 遺伝子を増幅する場合はプライマー (a-7) と (b-7)、ラクトバチルス ブレビス dec/LB 遺伝子を増幅する場合はプライマー (a-8) と (b-8) の組み合わせ、シュードモナス プチダ dec/PP 遺伝子を増幅する場合はプライマー (a-9) と (b-9) の組み合わせ、エシェリキア コリ dec/EC 遺伝子を増幅する場合はプライマー (a-10) と (b-10) の組み合わせ、サッカロマイセス セレビシエ dec/SC 遺伝子を増幅する場合はプライマー (a-11) と (b-11) の組み合わせ、エンテロバクター クロアカエ dec/ECL 遺伝子を増幅する場合はプライマー (a-12) と (b-12) の組み合わせで行った。

20

【 0 0 7 8 】

PCR サイクル：

デナチュレーション過程	： 94°C	60 秒
アニーリング過程	： 52°C	60 秒
エクステンション過程	： 72°C	

バチラス サブチリス	dec/BS 遺伝子	137 秒
ラクトバチルス ラムノーサス	dec/LR 遺伝子	123 秒
ラクトバチルス ブレビス	dec/LB 遺伝子	123 秒
シュードモナス プチダ	dec/PP 遺伝子	45 秒
エシェリキア コリ	dec/EC 遺伝子	94 秒
サッカロマイセス セレビシエ	dec/SC 遺伝子	103 秒
エンテロバクター クロアカエ	dec/ECL 遺伝子	135 秒

30

以上を 1 サイクルとし、30 サイクル行った。

40

【 0 0 7 9 】

上記で生成した反応液 10 μl を 0.8% アガロースゲルにより電気泳動を行い、バチラス サブチリス dec/BS 遺伝子の場合約 2.3-kb、ラクトバチルス ラムノーサス dec/LR 遺伝子の場合約 2.1-kb、ラクトバチルス ブレビス dec/LB 遺伝子の場合約 2.0-kb、シュードモナス プチダ dec/PP 遺伝子の場合約 0.6-kb、エシェリキア コリ dec/EC 遺伝子の場合約 1.6-kb、サッカロマイセス セレビシエ dec/SC 遺伝子の場合約 1.7-kb、エンテロバクター クロアカエ dec/ECL 遺伝子の場合約 2.3-kb の DNA 断片が検出できた。

【 0 0 8 0 】

(4) アニリン生産遺伝子発現プラスミドの構築
アニリン生産遺伝子の pCRB207 へのクローニング

50

上記項(3)に示したPCRにより増幅したサッカロマイセス セレビシエ株由来 dec/SC遺伝子を含む約1.7-kbの DNA断片10 µl及びPgapAプロモーターを含有するクローニングベクター-pCRB207 2 µlを制限酵素NcoIで切断し、70 °Cで10分処理させることにより制限酵素を失活させた後、両者を混合し、これにT4 DNAリガーゼ10×緩衝液 1 µl、T4 DNAリガーゼ(タカラバイオ株式会社製) 1 unitの各成分を添加し、滅菌蒸留水で10 µlにして、15 °Cで3時間反応させ、結合させた。これをライゲーションE液とした。

得られたライゲーションE液を、塩化カルシウム法〔Journal of Molecular Biology, 53, 159 (1970)〕によりエシェリヒア コリJM109を形質転換し、カナマイシン50 µg/mlを含む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、および1.5% 寒天〕に塗布した。

培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出、該プラスミドを制限酵素でそれぞれ切断し、挿入断片を確認した。この結果、プラスミドpCRB207約5.1-kbのDNA断片に加え、サッカロマイセス セレビシエ株由来dec/SC遺伝子(ライゲーションE液)の場合、長さ約1.7-kbの挿入断片が認められた。

サッカロマイセス セレビシエ株由来dec/SC遺伝子を含むプラスミドをpCRB207-dec/SCと命名した(図1)。

【0081】

アニリン生産遺伝子のpCRB209へのクローニング

上記項(3)に示したPCRにより増幅したバチラス サブチリス株由来dec/BS遺伝子を含む約2.3-kbの DNA断片、ラクトバチルス ラムノーサス株由来dec/LR遺伝子を含む約2.1-kbの DNA断片、ラクトバチルス プレビス株由来dec/LB遺伝子を含む約2.0-kbの DNA断片、シュードモナス プチダ株由来dec/PP遺伝子を含む約0.6-kbの DNA断片、エシェリキア コリ株由来dec/EC遺伝子を含む約1.6-kbの DNA断片、エンテロバクター クロアカエ株由来dec/ECL遺伝子を含む約2.3-kbの DNA断片10 µl及びPgapAプロモーターを含有するクローニングベクター-pCRB209 2 µlを各々制限酵素NdeIで切断し、70 °Cで10分処理させることにより制限酵素を失活させた後、両者を混合し、これにT4 DNAリガーゼ10×緩衝液 1 µl、T4 DNAリガーゼ(タカラバイオ株式会社製) 1 unitの各成分を添加し、滅菌蒸留水で10 µlにして、15 °Cで3時間反応させ、結合させた。これをライゲーションF液、G液、H液、I液、J液及びK液とした。

【0082】

得られた6種のライゲーションF液、G液、H液、I液、J液及びK液それぞれを、塩化カルシウム法〔Journal of Molecular Biology, 53, 159 (1970)〕によりエシェリヒア コリJM109を形質転換し、カナマイシン50 µg/mlを含む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、および1.5% 寒天〕に塗布した。

各々の培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出、該プラスミドを制限酵素でそれぞれ切断し、挿入断片を確認した。この結果、プラスミドpCRB209約5.1-kbのDNA断片に加え、バチラス サブチリス株由来dec/BS遺伝子(ライゲーションF液)の場合、長さ約2.3-kbの挿入断片が、ラクトバチルス ラムノーサス株由来dec/LR遺伝子(ライゲーションG液)の場合、長さ約2.1-kbの挿入断片が、ラクトバチルス プレビス株由来dec/LB遺伝子(ライゲーションH液)の場合、長さ約2.0-kbの挿入断片が、シュードモナス プチダ株由来dec/PP遺伝子(ライゲーションI液)の場合、長さ約0.6-kbの挿入断片が、エシェリキア コリ株由来dec/EC遺伝子(ライゲーションJ液)の場合、長さ約1.6-kbの挿入断片が、エンテロバクター クロアカエ株由来dec/ECL遺伝子(ライゲーションK液)の場合、長さ約2.3-kbの挿入断片が認められた。

【0083】

バチラス サブチリス株由来dec/BS遺伝子を含むプラスミドをpCRB209-dec/BS、ラクトバチルス ラムノーサス株由来dec/LR遺伝子を含むプラスミドをpCRB209-dec/LR、ラクトバチルス プレビス株由来dec/LB遺伝子を含むプラスミドをpCRB209-dec/LB、シュードモナス プチダ株由来dec/PP遺伝子を含むプラスミドをpCRB209-dec/PP、エシェリキア コリ株由来dec/EC遺伝子を含むプラスミドをpCRB209-dec/EC、エンテロバクター クロアカエ

10

20

30

40

50

株由来dec/ECL遺伝子を含むプラスミドをpCRB209-dec/ECLとそれぞれ命名した(図1)。

【0084】

(5) アニリン生産遺伝子導入株の構築

上述のプラスミド6種類pCRB209-dec/BS、pCRB209-dec/LR、pCRB209-dec/LB、pCRB209-dec/PP、pCRB209-dec/EC、pCRB207-dec/SC及びpCRB209-dec/ECLを用いて、電気パルス法 [Agric. Biol. Chem., Vol.54, 443-447(1990) 及び Res. Microbiol., Vol.144, 181-185 (1993)] により、コリネバクテリウム グルタミカム R 株を形質転換し、カナマイシン 50 µg/mlを含むA寒天培地に塗布した。

この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出、該プラスミドを制限酵素で切断し、挿入断片を確認した。この結果、上記で作製のプラスミド pCRB209-dec/BS、pCRB209-dec/LR、pCRB209-dec/LB、pCRB209-dec/PP、pCRB209-dec/EC、pCRB207-dec/SC及びpCRB209-dec/ECLの導入が認められた。

【0085】

pCRB209-dec/BSプラスミドを導入した株をコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) ANI-1、pCRB209-dec/LRプラスミドを導入した株をコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) ANI-2、pCRB209-dec/LBプラスミドを導入した株をコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) ANI-3、pCRB209-dec/PPプラスミドを導入した株をコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) ANI-4、pCRB209-dec/ECプラスミドを導入した株をコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) ANI-5、pCRB207-dec/SCプラスミドを導入した株をコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) ANI-6、pCRB209-dec/ECLプラスミドを導入した株をコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) ANI-7と命名した。

【0086】

コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) ANI-1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寄託した(受託日:2010年11月16日、受託番号:NITE BP-1001)。

【0087】

実施例2 コリネバクテリウム グルタミカム アニリン生産遺伝子導入株のアントラニル酸からのアニリン生成実験

実施例1において作製したコリネバクテリウム グルタミカムANI-1~ANI-7株を、カナマイシン50 µg/mlを含むA寒天培地[(NH₂)₂CO 2g、(NH₄)₂SO₄ 7g、KH₂PO₄ 0.5 g、K₂HPO₄ 0.5 g、MgSO₄·7H₂O 0.5 g、0.06% (w/v) Fe₂ SO₄·7H₂O + 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、glucose 40 g、寒天 15 gを蒸留水1Lに懸濁]に塗布し、33℃、20時間暗所に静置した。

【0088】

上記のプレートで生育したコリネバクテリウム グルタミカムANI-1~ANI-7株を、カナマイシン50 µg/mlを含有したA液体培地10mlの入った試験管に一白金耳植菌し、33℃にて20時間、好氣的に振盪培養を行った。このようにして培養増殖されたそれぞれの菌体は、遠心分離(4℃、15,000×g、10分)により菌体を回収した。得られた菌体を、10 mlのBT液体培地[(NH₂)₂CO 2g、(NH₄)₂SO₄ 7g、KH₂PO₄ 0.5 g、K₂HPO₄ 0.5 g、MgSO₄·7H₂O 0.5 g、0.06% (w/v) Fe₂ SO₄·7H₂O + 0.042% (w/v) MnSO₄·2H₂O 1 ml、0.02% (w/v) biotin solution 1 ml、0.01% (w/v) thiamin solution 2 ml]で2回洗浄した後、OD₆₁₀=10となるようにBT液体培地で懸濁した。この菌体懸濁液を容量15ml遠心管に入れ、還元条件下(酸化還元電位;-450 mV)、基質としてアントラニル酸を25 mMとなるように添加し、33℃に保った水浴中で攪拌しながら6時間反応させた。サンプリングした反応液を遠心分離(4℃、15,000×g、10分)し、得られた上清液を用いてアニリンをGC/MSによって定量した。

この結果、コリネバクテリウム グルタミカムANI-1~ANI-7株は、還元条件下における

反応において、下記表1のようにアニリンを生成していた。

【0089】

【表1】

アントラニル酸を基質とした場合のコリネバクテリウム グルタミカム
ANI-1~ANI-7株のアニリン生成実験

菌株名	宿主株	アミノベンゾエート デカルボキシラーゼ遺伝子の由来	アニリン生産量 (mM)
ANI-1	Corynebacterium glutamicum (野生株)	バチラス サブチリス (Bacillus subtilis)	0.75
ANI-2		ラクトバチルス ラムノーサス (Lactobacillus rhamnosus)	0.7
ANI-3		ラクトバチラス ブレビス (Lactobacillus brevis)	0.6
ANI-4		シュードモナス プチダ (Pseudomonas putida)	0.6
ANI-5		エシェリキア コリ (Escherichia coli)	0.5
ANI-6		サッカロマイセス セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)	0.5
ANI-7		エンテロバクター クロアカエ (Enterobacter cloacae)	0.5

なお、カナマイシンを培地に添加しないこと以外は上記と同様の実験をコリネバクテリウム グルタミカム野生株に対して行ったところ、アニリン生成は認められなかった。

【0090】

実施例3 コリネバクテリウム グルタミカム アニリン生産遺伝子導入株の4-アミノベンゾエートからのアニリン生成実験

実施例1において作製したコリネバクテリウム グルタミカムANI-1~ANI-7株を、カナマイシン50 µg/mlを含むA寒天培地[(NH₂)₂CO 2g、(NH₄)₂SO₄ 7g、KH₂PO₄ 0.5 g、K₂HPO₄ 0.5 g、MgSO₄·7H₂O 0.5 g、0.06% (w/v) Fe₂ SO₄·7H₂O + 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、glucose 40 g、寒天 15 gを蒸留水1Lに懸濁]に塗布し、33℃、20時間暗所に静置した。

【0091】

上記のプレートで生育したコリネバクテリウム グルタミカムANI-1~ANI-7株を、カナマイシン50 µg/mlを含有したA液体培地10mlの入った試験管に一白金耳植菌し、33℃にて20時間、好氣的に振盪培養を行った。このようにして培養増殖されたそれぞれの菌体は、遠心分離(4℃、15,000×g、10分)により菌体を回収した。得られた菌体を、10 mlのBT液体培地[(NH₂)₂CO 2g、(NH₄)₂SO₄ 7g、KH₂PO₄ 0.5 g、K₂HPO₄ 0.5 g、MgSO₄·7H₂O 0.5 g、0.06% (w/v) Fe₂ SO₄·7H₂O + 0.042% (w/v) MnSO₄·2H₂O 1 ml、0.02% (w/v) biotin solution 1 ml、0.01% (w/v) thiamin solution 2 ml]で2回洗浄した後、OD₆₁₀=10となるようにBT液体培地で懸濁した。この菌体懸濁液を容量15ml遠心管に入れ、還元条件下(酸化還元電位; -450 mV)、基質として4-アミノベンゾエートを5 mMとなるように添加し、33℃に保った水浴中で攪拌しながら6時間反応させた。サンプリングした反応液を遠心分離(4℃、15,000×g、10分)し、得られた上清液を用いてアニリンをGC/MSによって定量した。

この結果、コリネバクテリウム グルタミカムANI-1～ANI-7株は、還元条件下における反応において、下記表2のようにアニリンを生成していた。

【0092】

【表2】

4-アミノベンゾエートを基質とした場合のコリネバクテリウム グルタミカム
ANI-1～ANI-7株のアニリン生成実験

菌株名	宿主株	アミノベンゾエート デカルボキシラーゼ遺伝子の由来	アニリン生産量 (mM)
ANI-1	Corynebacterium glutamicum (野生株)	バチラス サブチリス (Bacillus subtilis)	0.7
ANI-2		ラクトバチルス ラムノーサス (Lactobacillus rhamnosus)	0.65
ANI-3		ラクトバチラス ブレビス (Lactobacillus brevis)	0.6
ANI-4		シュードモナス プチダ (Pseudomonas putida)	0.6
ANI-5		エシェリキア コリ (Escherichia coli)	0.5
ANI-6		サッカロマイセス セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)	0.5
ANI-7		エンテロバクター クロアカエ (Enterobacter cloacae)	1.25

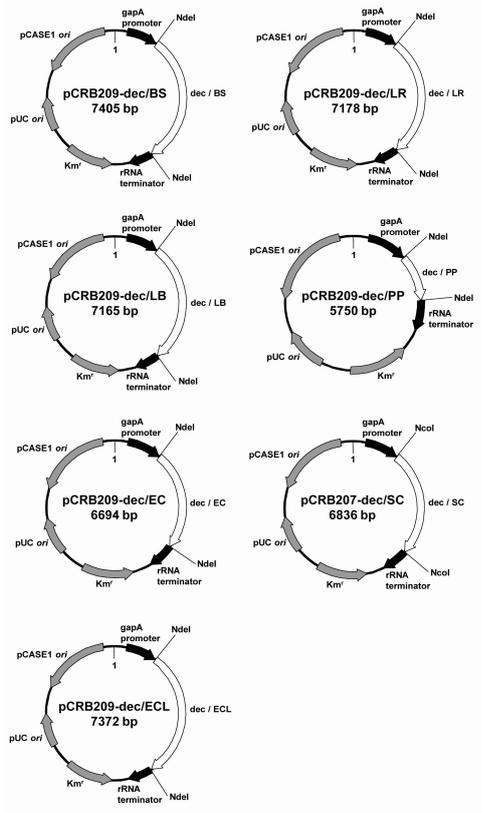
なお、カナマイシンを培地に添加しないこと以外は上記と同様の実験をコリネバクテリウム グルタミカム野生株に対して行ったところ、アニリン生成は認められなかった。

【産業上の利用可能性】

【0093】

本発明方法によれば、微生物を用いて実用的な効率でアミノ安息香酸からアニリンを製造することができる。

【 図 1 】



【 配列表 】

0005940985000001.app

フロントページの続き

審査官 濱田 光浩

(56)参考文献 特開2006-050914(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/21

C12P 13/00

C12N 15/09

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS(STN)

WPIDS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

SwissProt/GeneSeq