

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6294309号  
(P6294309)

(45) 発行日 平成30年3月14日(2018.3.14)

(24) 登録日 平成30年2月23日(2018.2.23)

(51) Int.Cl.

F I

<b>C 1 2 N</b>	<b>1/21</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	1/21	
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	15/00	Z N A A
<b>C 1 2 P</b>	<b>13/00</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 P	13/00	
<b>C 1 2 R</b>	<b>1/15</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	1/21	
			C 1 2 R	1:15	

請求項の数 9 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-512348 (P2015-512348)  
 (86) (22) 出願日 平成26年3月4日(2014.3.4)  
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2014/055521  
 (87) 国際公開番号 W02014/171205  
 (87) 国際公開日 平成26年10月23日(2014.10.23)  
 審査請求日 平成29年1月26日(2017.1.26)  
 (31) 優先権主張番号 特願2013-86693 (P2013-86693)  
 (32) 優先日 平成25年4月17日(2013.4.17)  
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

特許法第30条第2項適用 公益社団法人日本農芸化学会2013年度大会、大会講演要旨集(2013年3月5日)公益社団法人日本農芸化学会発行、講演番号3B12p17に発表。

(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  
 (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  
 (74) 代理人 100077012  
 弁理士 岩谷 龍  
 (72) 発明者 藤倉 慶太郎  
 兵庫県神戸市中央区脇浜町3丁目6番9号  
 住友ゴム工業株式会社内  
 (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

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アニリン生産性の向上した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】

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バクテリウム属菌に導入された、アニリン生産能を有する形質転換体であって、前記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が、

(i) 配列番号2で表されるアミノ酸配列から構成され、該アミノ酸配列において、N末端から309番目のプロリン(P)が、メチオニン(M)、バリン(V)、グルタミン(Q)、スレオニン(T)、セリン(S)及びアルギニン(R)からなる群から選ばれる1種のアミノ酸へ置換される変異を有する酵素であるか、又は

(ii) 配列番号2で表されるアミノ酸配列から構成され、該アミノ酸配列において、N末端から309番目のプロリン(P)が、メチオニン(M)、バリン(V)、グルタミン(Q)、スレオニン(T)、セリン(S)及びアルギニン(R)からなる群から選ばれる1種のアミノ酸へ置換される変異と1~数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入及び/又は付加される変異をさらに有する酵素であり、該酵素をコードする塩基配列が前記(i)の酵素をコードする塩基配列と98%以上の同一性を有する酵素である、ことを特徴とする形質転換体。

【請求項2】

前記変異が、N末端から309番目のプロリン(P)の、メチオニン(M)、バリン(V)及びグルタミン(Q)からなる群から選ばれる1種のアミノ酸への置換であることを特徴とする請求項1に記載の形質転換体。

10

20

## 【請求項 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、エンテロバクター クロアカエ (Enterobacter cloacae) 由来の遺伝子である請求項 1 又は 2 に記載の形質転換体。

## 【請求項 4】

宿主の コリネバクテリウム属菌が、コリネバクテリウム グルタミカムである請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の形質転換体。

## 【請求項 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 グルタミカム R (FERM P-18976 (国際受託番号: FERM BP-18976))、ATCC13032、又はATCC13869である請求項 4 に記載の形質転換体。

10

## 【請求項 6】

コリネバクテリウム グルタミカム ANI-13 (受託番号: NITE P-01583 (国際受託番号: NITE BP-01583)) 形質転換体、コリネバクテリウム グルタミカム ANI-14 (受託番号: NITE P-01584 (国際受託番号: NITE BP-01584)) 形質転換体又はコリネバクテリウム グルタミカム ANI-15 (受託番号: NITE P-01585 (国際受託番号: NITE BP-01585)) 形質転換体。

## 【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいず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/又はそれら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。

20

## 【請求項 8】

反応工程において、形質転換体 が 増殖しない請求項 7 に記載のアニリンの製造方法。

## 【請求項 9】

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

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、アニリン生産性を向上するよう改善された酵素の突然変異体に関し、該突然変異体を使用してアニリン生産性を付与する為に特定の遺伝子操作が施されたコリネ型細菌形質転換体、及びこの形質転換体を用いた効率的なアニリン生成方法も提供する。

30

## 【背景技術】

## 【0002】

近年の化石資源枯渇問題とそれに伴う化石資源の価格高騰、地球温暖化問題を解決する為に、化成品の化石資源に依存しない製造プロセスが求められている。その解決手段の一つとして、バイオマス資源、とりわけ非可食バイオマス資源を原料としたバイオリファイナリー技術が大きな注目を集めている。

## 【0003】

アニリンは、染料、機能性ポリマー、加硫促進剤や老化防止剤等のタイヤ用ゴム薬品、農薬、医薬品等の合成出発原料として広く使用されている。

40

## 【0004】

現在、アニリンは、原油を原料として化学変換によって生産されている。具体的には、原油を蒸留分離して得られるナフサより得られたベンゼンを原料としている。より具体的には、ベンゼンをニトロ化してニトロベンゼンとして、銅やニッケル等の金属触媒を用いる方法や、ニトロベンゼンを鉄と塩酸で還元する事によって水素添加する方法、もしくは高温高压条件下でクロロベンゼンとアンモニアとを反応させる方法が挙げられる。

## 【0005】

しかしながら、これらの方法は、出発物質であるベンゼンを化石原料に依存しているだけでなく、反応プロセス中で高温高压条件を必要とするため、生産過程において、大量の

50

化石燃料を消費し、二酸化炭素等の温室効果ガスを排出するという問題がある。そこで、再生可能資源を原料とし、原材料や製造過程において化石資源に依存することのない、環境調和型バイオプロセスの開発が求められている。

【0006】

アニリンをはじめとした芳香族化合物をバイオプロセスで生産する場合、微生物や植物が持つシキミ酸経路とよばれる合成経路を利用することが考えられるが、原料となる糖類からの代謝反応ステップ数が非常に多いことから生産性が低いという難点がある。

【0007】

さらに、アニリンをバイオプロセスで生産する場合、アニリンによる細胞毒性、微生物の増殖阻害等の影響により、微生物の生育自体が阻害される。このため、アニリンのバイオプロセスによる工業的生産は非常に困難である。

10

【0008】

これまで、非遺伝子組み換え菌によるアニリン生成技術は、*Mycobacterium smegmatis* に4-アミノ安息香酸を添加してアニリンを生成したという例(非特許文献1)、及び病原性大腸菌*Escherichia coli* O111:B4の細胞又は細胞抽出液に、アントラニル酸又は4-アミノ安息香酸を添加してアニリンを生成したという例(非特許文献2)が開示されている。

【0009】

しかしながら、これらは、アニリン生成に関わる酵素分子及び酵素遺伝子について特定されておらず、その後の報告もなされていない。非特許文献1では、7.3 mMの4-アミノ安息香酸からアニリン生成を報告しているが、生成濃度が6.9 μMと極めて微量であり、また、アニリンの同定方法がペーパークロマトグラフィーでの比較によって行われており、物質同定の真偽が不明である。

20

【0010】

非特許文献2では、使用する微生物が病原性を有するという問題があり、工業的生産に向かない。また、この場合のアニリン同定は、ジアゾ発色による間接同定によって行われており、物質同定の真偽が不明である。この他、一般にアニリンの細胞毒性によって微生物の増殖が阻害され、高濃度のアニリン生成が困難であるという問題がある。

【0011】

また、本発明者らは、アミノ安息香酸デカルボキシラーゼ活性を有する酵素をコードする、エンテロバクター クロアカエ由来の遺伝子を宿主のコリネ型細菌に導入された形質転換体が、5 mMの4-アミノ安息香酸から1.25 mMのアニリンを製造することを既に見出しているが(特許文献1)、工業的生産コスト低減のためには、より高濃度のアニリン生産レベルが必要であり、アミノ安息香酸デカルボキシラーゼ活性のさらなる改善が必要である。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0012】

【特許文献1】WO2012/090978号パンフレット

【非特許文献】

40

【0013】

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

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

)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

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に変換する酵素、及び酵素をコードする遺伝子、この遺伝子を宿主としてアミノ安息香酸を原料として効率よくアニリンを製造する微生物、この微生物を用いて効率よくアニリンを製造する方法を提供するこ

50

とを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明者らは、エンテロバクター クロアカエ (*Enterobacter cloacae*) 由来のアミノベンゾエート デカルボキシラーゼ (aminobenzoate decarboxylase) をコードする遺伝子をコリネ型細菌に導入した形質転換体が、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。

【0016】

さらに、エンテロバクター クロアカエ由来の4-ヒドロキシ安息香酸デカルボキシラーゼのアニリン生産性を一段と高めることを目的として、鋭意研究を重ねた結果、N末端から309番目のプロリン (P) がスレオニン (T) に置換された突然変異体を見出すことができ、この突然変異体をコードする遺伝子をコリネ型細菌に導入した形質転換体のアニリン生産性が増大することを見出した。

加えて、N末端から309番目のプロリン (P) をメチオニン (M)、バリン (V)、グルタミン (Q)、セリン (S)、アルギニン (R) のいずれかに置換した部位特異的変異体をコードする遺伝子をコリネ型細菌に導入した形質転換体では、アニリン生産性が更に増大することを見出し、本発明を完成するに至った。

この他、本発明者らは、遺伝子組み換え宿主として汎用される大腸菌にアニリンを添加して好気培養を行った結果、アニリン濃度20mM以上であると増殖に多大な影響がみられるが、アミノ酸生産菌として知られるコリネ型細菌の場合は、アニリン濃度を60mMにまで上げて増殖可能であることを見出した。即ち、遺伝子組み換え宿主として汎用される大腸菌よりもコリネ型細菌のアニリン耐性が高く、従ってアニリンの工業的生産性に優れていることを見出した (図2、図3)。

【0017】

すなわち、本発明は以下の発明に関する。

[1] 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、アニリン生産能を有する形質転換体であって、前記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が配列番号2で表されるアミノ酸配列から構成され、前記アミノ酸配列が少なくともN末端から309番目のプロリン (P) に変異を有することを特徴とする形質転換体。

[2] 前記変異が、N末端から309番目のプロリン (P) の、メチオニン (M)、バリン (V)、グルタミン (Q)、スレオニン (T)、セリン (S) 及びアルギニン (R) からなる群から選ばれる1種以上のアミノ酸への置換であることを特徴とする前記 [1] 記載の形質転換体。

[3] 前記変異が、N末端から309番目のプロリン (P) の、メチオニン (M)、バリン (V) 及びグルタミン (Q) からなる群から選ばれる1種以上のアミノ酸への置換であることを特徴とする前記 [1] 又は [2] に記載の形質転換体。

[4] 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、エンテロバクター クロアカエ (*Enterobacter cloacae*) 由来の遺伝子である前記 [1] ~ [3] のいずれか1項に記載の形質転換体。

[5] 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前記 [1] ~ [4] のいずれか1項に記載の形質転換体。

[6] 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 P-18976 (FERM BP-18976)、ATCC13032、又はATCC13869である前記 [5] に記載の形質転換体。

[7] コリネバクテリウム グルタミカム ANI-13 (受託番号: NITE P-01583 (NITE BP-01583) 形質転換体、コリネバクテリウム グルタミカム ANI-14 (受託番号: NITE P-01584 (NITE BP-01584) 形質転換体又はコリネバクテリウム グルタミカム ANI-15 (受託番号: NITE P-01585 (NITE BP-01585) 形質転換体。

[8] 前記 [1] ~ [7] のいずれかに記載の形質転換体を、還元条件下、アミノ安息香

10

20

30

40

50

酸、そのエステル、及び/又はそれら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。

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

[ 10 ] 還元条件下の反応液の酸化還元電位が - 200 ~ - 500 ミリボルトである前記 [ 8 ] 又は [ 9 ] に記載のアニリンの製造方法。

【発明の効果】

【 0018 】

本発明の突然変異体をコードする遺伝子をコリネ型細菌に導入した形質転換体を用いることにより、アミノ安息香酸、そのエステル、及び/又はそれらの塩から、アニリンを高効率で製造することができる。

10

【図面の簡単な説明】

【 0019 】

【図 1】製造例 1 で用いたプラスミドの構成を示す図である。

【図 2】試験例 1 のエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) HST02 株を用いて培地中のアニリンが増殖に与える影響を測定した結果を示す。

【図 3】試験例 1 のコリネバクテリウム グルタミカム R 株を用いて培地中のアニリンが増殖に与える影響を測定した結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【 0020 】

以下、本発明を詳細に説明する。

20

【 0021 】

本発明の態様の一つとして、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構成する配列番号 2 で表されるアミノ酸配列のうち少なくとも N 末端から 309 番目のプロリン (P) が、プロリン以外のアミノ酸へ置換された変異を含む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が挙げられる。

【 0022 】

宿主

コリネ型細菌とは、バーゲーズ・マニュアル・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、プレビバクテリウム属菌、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。

30

【 0023 】

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 (国際受託番号: 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-233AB-41 (FERM BP-1498) 等が挙げられる。中でも、R 株 (FERM P-18976 (国際受託番号: FERM BP-18976))、ATCC13032 株、ATCC13869 株が好ましい。

40

【 0024 】

なお、分子生物学的分類により、プレビバクテリウム フラバム (*Brevibacterium flav*

50

um)、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)]。

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) 等も好適なコリネバクテリウム グルタミカムである。

【0025】

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。

【0026】

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。

【0027】

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。

【0028】

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。

【0029】

また、コリネ型細菌は、野生型の他に、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) 等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。

【0030】

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 (国際受託番号: 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。

【0031】

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。

【0032】

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の方法によるアニリン製造に好適である。

10

20

30

40

50

## 【0033】

アミノベンゾエート デカルボキシラーゼ

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。

## 【0034】

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、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。特に、4 - アミノ安息香酸を基質とした場合、エンテロバクター クロアカエ由来の遺伝子が好ましい。

## 【0035】

本発明に用いられるエンテロバクター クロアカエ由来遺伝子としては、例えば、配列番号1の塩基配列によってコードされるアミノ酸配列において、少なくともN末端から309番目のプロリン(P)に変異が導入され、前記変異を導入されたアミノ酸配列がアミノベンゾエート デカルボキシラーゼ活性を有し、前記変異に対応する塩基の改変がなされた塩基配列(以下、「変異を含む塩基配列」という)を有するDNAが挙げられる。前記変異としては、1~数個のアミノ酸が、置換、欠失、挿入及び/又は付加されることを意味する。前記数個とは、特に限定されないが、通常2~8個であり、2~6個が好ましく、2~3個がより好ましい。前記遺伝子としては、好ましくは、少なくとも前記プロリン(P)が、プロリン以外の1種以上のアミノ酸へ置換された変異を含み、前記変異を導入されたアミノ酸配列がアミノベンゾエート デカルボキシラーゼ活性を有し、前記アミノ酸の変異に対応する塩基の改変がなされた塩基配列を有するDNAが挙げられる。

## 【0036】

本発明に用いられるエンテロバクター 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活性を有する酵素としては、配列番号2で表されるアミノ酸配列において、少なくともN末端から309番目のプロリン(P)に変異が導入された変異体が挙げられる。本発明の変異体としては、アミノベンゾエート デカルボキシラーゼ活性を有する限り、特に限定されず、N末端から309番目のプロリン(P)に変異が導入されたものも含まれる。前記変異としては、1~数個のアミノ酸が、置換、欠失、挿入及び/又は付加されることを意味する。前記数個とは、特に限定されないが、通常2~8個であり、2~6個が好ましく、2~3個がより好ましい。前記変異体としては、特に限定されないが、好適には、配列番号2で表されるアミノ酸配列において、少なくとも前記プロリン(P)が、メチオニン(M)、バリン(V)、グルタミン(Q)、スレオニン(T)、セリン(S)及びアルギニン(R)からなる群から選ばれる1種以上のアミノ酸へ置換された酵素が挙げられ、より好ましくは、少なくとも前記プロリン(P)が、メチオニン(M)、バリン(V)及びグルタミン(Q)からなる群から選ばれる1種以上のアミノ酸へ置換された変異を含む酵素が挙げられる。

## 【0037】

また、本発明では、前記の変異を含む塩基配列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。本発明において「ストリンジент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<sub>m</sub>)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。例えば、0.1% SDS、0.5 x SSC中で、65~68 にて15分間 x 2回等が挙げられる。

## 【0038】

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 (pH 7.0)を緩衝

10

20

30

40

50

液として2.5 mM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5 mMになるように添加する。3300 rpm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 µm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。

【0039】

また、本発明では、前記の変異を含む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。

10

【0040】

前記の変異を含む塩基配列からなる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。

【0041】

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。

20

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)]、コリネバクテリウムグルタミカム ATCC 13058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号公報]、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。

30

【0042】

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。

40

【0043】

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ターミネーター等が挙げられ、中でも、rrnB T1T2ターミネーターが好ましい。

【0044】

形質転換

50



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、D E A E - デキストラン 介在トランスフェクション、電気穿孔法等が挙げられる。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。

【 0 0 4 5 】

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又は合成培地等を用いることができる。

10

【 0 0 4 6 】

形質転換体に用いる前記炭素源としては、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 ~ 1 0 ( w / v % ) とすればよい。

20

【 0 0 4 7 】

形質転換体に用いる前記窒素源としては、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、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、N Z - 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 ~ 1 0 ( w / v % ) とすればよい。

【 0 0 4 8 】

形質転換体に用いる前記無機塩類としては、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 . 0 1 ~ 1 ( w / v % ) とすればよい。

30

【 0 0 4 9 】

形質転換体に用いる前記栄養物質としては、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 ~ 1 0 ( 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、ピオチン、チアミン ( ビタミン B 1 ) 、ピリドキシン ( ビタミン B 6 ) 、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。

40

【 0 0 5 0 】

形質転換体に用いる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)]、B T 培地 [Omumasaba, C.A. et al., Corynebacterium glutamicum glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoforms with opposite, ATP-dependent regulation. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 8:91-103 (2004)] 等が挙げられる。

50

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。

#### 【0051】

##### 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、そのエステル、及び/又はそれらの塩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。

#### 【0052】

##### 微生物の増殖

アニリンの製造における反応に先立ち、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。

10

#### 【0053】

##### 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を用いることができる。

前記好氣的培養における炭素源として、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

20

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。

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。

#### 【0054】

前記好氣的培養における窒素源としては、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

30

#### 【0055】

前記好氣的培養における無機塩類としては、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。

#### 【0056】

前記好氣的培養における栄養物質としては、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。

40

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。培地の pH は約 6 ~ 8 が好ましい。

#### 【0057】

前記好氣的培養における、具体的な好ましいコリネ型細菌用培地としては、A 培地〔In ui, M. et al., Metabolic analysis of *Corynebacterium glutamicum* during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions. J. Mol. Microbiol.

50

Biotechnol. 7:182-196 (2004) ]、B T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。

#### 【 0 0 5 8 】

##### 反応液

本発明のアニリン製造における反応液は、アニリン前駆体（アニリン原料）を含有する水、緩衝液、無機塩培地等を用いることができる。

前記前駆体としては、アミノ安息香酸、そのエステル、及び/又はそれらの塩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）のいずれも使用できる。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。

10

#### 【 0 0 5 9 】

前記アミノ安息香酸の塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、塩酸塩等が挙げられる。また、前記アミノ安息香酸のエステルとしては、炭素数 1 ~ 4 のアルコールとのエステル等が挙げられる。前記アニリン前駆体としては、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。

#### 【 0 0 6 0 】

反応液中のアミノ安息香酸、そのエステル、及び/又はそれらの塩の濃度は、0 . 1 ~ 5 0 0 m M が好ましく、0 . 5 ~ 3 0 0 m M がより好ましく、1 ~ 2 0 0 m M がさらにより好ましい。上記範囲であれば、効率良く、アニリンを製造できる。

20

#### 【 0 0 6 1 】

前記反応液における緩衝液としては、リン酸バッファー、トリスバッファー、炭酸バッファー等が挙げられる。緩衝液の濃度は、約 1 0 ~ 1 5 0 m M が好ましい。

#### 【 0 0 6 2 】

前記反応液における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、B T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 . 0 1 ~ 1 ( w / v % ) とすればよい。

30

#### 【 0 0 6 3 】

反応液の pH は約 5 ~ 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等を用いて、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 6 ~ 7 にコントロールしながら反応させることが好ましい。

#### 【 0 0 6 4 】

##### 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 2 0 ~ 4 0 が好ましく、約 2 5 ~ 3 5 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。

40

#### 【 0 0 6 5 】

##### 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。

50

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 - 2 0 0 m V ~ - 5 0 0 m V が好ましく、約 - 2 5 0 m V ~ - 5 0 0 m V 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。

#### 【 0 0 6 6 】

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、蒸留水等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等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」等が参考となり、所望する還元条件下の水溶液を得ることができる。

10

#### 【 0 0 6 7 】

具体的には、蒸留水等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、通常約 1 0 m m H g 以下、好ましくは約 5 m m H g 以下、より好ましくは約 3 m m H g 以下の減圧下で、約 1 ~ 6 0 分程度、好ましくは約 5 ~ 4 0 分程度、蒸留水等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。

20

#### 【 0 0 6 8 】

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。

#### 【 0 0 6 9 】

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。

30

#### 【 0 0 7 0 】

##### 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。なお、蒸留法、膜透過法、有機溶媒抽出法は、従来十分に確立されているので、本発明においてもそれに従ってよい。

40

#### 【 0 0 7 1 】

本発明は、本発明の効果を奏する限り、本発明の技術的範囲内において、上記の構成を種々組み合わせた態様を含む。

#### 【実施例】

#### 【 0 0 7 2 】

次に、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例により何ら限定されるものではなく、多くの変形が本発明の技術的思想内で当分野において通常の知識を有する者により可能である。

#### 【 0 0 7 3 】

50

[ 製造例 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

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, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 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℃で振とう培養し、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。

【 0 0 7 4 】

(2) クローニングベクターの構築

10

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3(pCASE1-ori配列)、配列番号4(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。

【 0 0 7 5 】

pCASE1-ori配列増幅用プライマー

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

20

(b-1) ; 5' - AT AGATCT GACTTGTTACGATGGAC -3' (配列番号6)

なお、プライマー(a-1)及び(b-1)には、BglII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7)

(b-2) ; 5' - AT AGATCT CGTGCCAGCTGCATTAATGA -3' (配列番号8)

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

【 0 0 7 6 】

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。

30

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 7 7 】

反応液:

TaKaRa LA Taq<sup>TM</sup> (5 units/μl) 0.5 μl

10X LA PCR<sup>TM</sup> Buffer II (Mg<sup>2+</sup> free) 5 μl

25mM MgCl<sub>2</sub> 5 μl

dNTP Mixture (2.5mM each) 8 μl

鋳型DNA 5 μl (DNA含有量 1 μg 以下)

40

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の反応液を用いてPCRを行った。

\*) 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 7 8 】

PCRサイクル:

デナチュレーション過程 : 94 60秒

アニーリング過程 : 52 60秒

50

エクステンション過程 : 72  
 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。

【0079】

上記で生成した反応液10μl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断片を検出した。

【0080】

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10μl及びクローニングベクター-pHSG298を含む約2.7-kb DNA断片10μlを各々制限酵素BglIIで切断し、70℃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1μl、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10μlにして、15℃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。

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50μg/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、及び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。

【0081】

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9（PgapA配列）、配列番号10（ターミネーター配列）を基に、それぞれ下記の対のプライマーを合成し、使用した。

【0082】

PgapA配列増幅用プライマー

(a-3) ; 5' - CTCT GTCGAC CCGAAGATCTGAAGATTCCTG -3' (配列番号11)

(b-3) ; 5' - CTCT GTCGAC GGATCC CCATGG TGTGTCTCCTCTAAAGATTGTAGG -3' (配列番号12)

なお、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13)

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

(配列番号14)

なお、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。

【0083】

鋳型DNAは、コリネバクテリウム グルタミカム R (FERM P-18976 (FERM BP-18976

10

20

30

40

50

)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。

【0084】

反応液：

TaKaRa LA Taq <sup>TM</sup> (5 units/μl)	0.5 μl	
10X LA PCR <sup>TM</sup> Buffer II (Mg <sup>2+</sup> free)	5 μl	
25mM MgCl <sub>2</sub>	5 μl	
dNTP Mixture (2.5mM each)	8 μl	10
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 <sup>*</sup> )	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の反応液を用いてPCRを行った。

<sup>\*</sup>) PgapA配列を増幅する場合はプライマー(a-3)と(b-3)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-4)と(b-4)の組み合わせで行った。

【0085】

dec/LR遺伝子増幅用プライマー

(a-5) ; 5' - CTCT CATATG ACAGCATCACCTTGGG -3' (配列番号15)

(b-5) ; 5' - CTCT CATATG TCATCTTAACGACGCTCCATTC -3' (配列番号16) 20

なお、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。

dec/LB遺伝子増幅用プライマー

(a-6) ; 5' - CTCT CATATG GTAAATGATCCTTATGATTTACGAAAAG -3'

(配列番号17)

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

なお、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。

【0086】

PCRサイクル：

デナチュレーション過程	: 94	60秒	
アニーリング過程	: 52	60秒	30
エクステンション過程	: 72		
	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。

【0087】

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。

【0088】

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Sallで切断し、70℃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℃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。 40

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、及び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 50

スミドを制限酵素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。

#### 【0089】

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、及び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。

#### 【0090】

##### 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19 (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。

#### 【0091】

pCRB207配列増幅用プライマー

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

(b-7) ; 5' - CTCT CATATG GTGTCTCCTCTAAAGATTGTAGG -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。

#### 【0092】

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 (タカラバイオ株式会社製)を用いて下記の条件で行った。

#### 【0093】

反応液：

TaKaRa LA Taq <sup>TM</sup> (5 units/µl)	0.5 µl
10X LA PCR <sup>TM</sup> Buffer II (Mg <sup>2+</sup> free)	5 µl
25mM MgCl <sub>2</sub>	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 <sup>*</sup> )	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の反応液を用いてPCRを行った。

\*)pCRB207配列を増幅する場合はプライマー(a-7)と(b-7)の組み合わせで行った。

#### 【0094】



dec/PP遺伝子増幅用プライマー

(a-8) ; 5' - CTCT CATATG AACGGGCCGGAAC -3' (配列番号22)

(b-8) ; 5' - CTCT CATATG TCAATCATCCACCCCGAAG -3' (配列番号23)

なお、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。

【0095】

PCRサイクル:

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

以上を1サイクルとし、30サイクル行った。

10

【0096】

上記で生成した反応液10µl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。

【0097】

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10µlを制限酵素NdeIで切断し、70℃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1µl、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10µlにして、15℃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。

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50µg/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、及び1.5% 寒天〕に塗布した。

20

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rrnBT1T2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。

【0098】

### (3) エンテロバクター クロアカエ由来のアニ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。

30

PCRに際して、dec/ECL遺伝子をクローン化するべく、配列番号24(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。

【0099】

dec/ECL遺伝子増幅用プライマー

(a-9) ; 5' - CTCT CATATG AGATTGATCGTGGGAATGAC -3' (配列番号25)

(b-9) ; 5' - CTCT CATATG TTACAGCAATGGCGGAATGG -3' (配列番号26)

なお、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。

40

【0100】

鋳型DNAは、エンテロバクター クロアカエは、NITE Biological Resource Center (NBR C)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。

【0101】

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。

反応液:

50

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

以上を混合し、この50  $\mu$ lの反応液を用いてPCRを行った。

\*)エンテロバクター クロアカエdec/ECL遺伝子を増幅時には、プライマー(a-9)と(b-9)の組み合わせで行った。

#### 【0102】

PCRサイクル:

デナチュレーション過程	: 94	60秒
アニーリング過程	: 52	60秒
エクステンション過程	: 72	
エンテロバクター クロアカエ dec/ECL遺伝子		135秒

以上を1サイクルとし、30サイクル行った。

#### 【0103】

上記で生成した反応液10  $\mu$ lを0.8%アガロースゲルにより電気泳動を行い、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。

#### 【0104】

#### (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pCRB209へのクローニング

上記項(3)に示したエンテロバクター 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  $\mu$ l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  $\mu$ lを各々制限酵素NdeIで切断し、70℃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 $\times$ 緩衝液 1  $\mu$ l、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  $\mu$ lにして、15℃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。

#### 【0105】

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  $\mu$ g/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、及び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、エンテロバクター クロアカエ株由来dec/ECL遺伝子の長さ約2.3-kbの挿入断片が認められた。

#### 【0106】

エンテロバクター クロアカエ株由来dec/ECL遺伝子を含むプラスミドをpCRB209-dec/ECLと命名した(図1)。

#### 【0107】

#### (5) アニリン生産遺伝子導入株の構築

上述のプラスミド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  $\mu$ g/mlを含むA寒天培地 [(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO 2g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g、0.06% (w/v) Fe<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O + 0.042% (w/v) MnSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 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] に塗布した。

10

20

30

40

50

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/ECLの導入が認められた。

【0108】

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。

【0109】

[実施例1]

エンテロバクター クロアカエ由来アミノベンゾエート デカルボキシラーゼをコードする遺伝子をターゲットとしたランダムミュートーションの導入を行い、アニリン生成量が  
10  
増大した株をスクリーニングすることによって突然変異株を取得した。具体的には、ランダムミュートーション導入キット(商品名: GeneMorphII Random Mutagenesis Kit、Agilent社製)を用いて、変異を導入した。具体的には、上述のpCRB209-dec/ECLプラスミドを鋳型として、プライマー1(5'-GTCGCTCCCATATGAGATTGATCGTG-3'、配列番号27)と、  
20  
プライマー2(5'-GCTCCTGCCATATGTTACAGCAATGG-3'、配列番号28)の組み合わせにより、前記キットの添付マニュアルに従いランダム変異を導入した。変異が導入されたDNA断片とプラスミドpCRB209を制限酵素Nde Iで消化し、70℃で10分処理させることにより制限酵素を失活させた後、精製を行った後、両者を混合し、これにT4 DNAリガーゼ10×緩衝液1μl、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10μlにして、15℃で3時間反応させ、結合させた。これをDNAライブラリーF液とした。

【0110】

このDNAライブラリーF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50μg/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、及び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を抽出し、ランダムに選択したクローン由来プラスミドのDNA塩基配列を決定して変異導入を確認した。次に、上記にて抽出したDNAライブラリー(プラスミドDNA混合物)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  
30  
株を形質転換し、カナマイシン 50μg/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、プラスミドpCRB209約5.1-kbのDNA断片に加え、エンテロバクター クロアカエ株由来dec/ECL遺伝子(P309部位におけるランダム変異体)の長さ約2.3-kbの挿入断片が認められた。

【0111】

この変異株では、アミノベンゾエート デカルボキシラーゼの3つのサブユニット(21.7 kDa, 52.5 kDa, 8.6 kDa)のうち、52.5 kDaサブユニット中のN末端から309番目のプロリン(P)がスレオニン(T)に置換されていた。

【0112】

[実施例2~6及び比較例2~3]

アミノ安息香酸デカルボキシラーゼの52.5 kDaサブユニット中のN末端から309番目のプロリン(P)を、スレオニン(T)以外のアミノ酸へそれぞれ置換した部位特異的変異導入を行った。具体的には、変異導入キット(商品名: PrimeSTAR(登録商標) Mutagenesis Basal Kit、タカラバイオ社製)を用いて、変異を導入した。具体的には、下記の条件で反応を行った。

PrimeSTARMax Premix (2x)	25 μl
Primer1 (Fwd)	5 μl (終濃度0.2 μM)
Primer2 (Rev)	5 μl (終濃度0.2 μM)
鋳型DNA	5 μl (2pg)

(pCRB209-dec/ECLプラスミド)

滅菌蒸留水 10  $\mu$ l

以上を混合し、この50  $\mu$ lの反応液を用いてPCRを行った。

【0113】

各変異体について、以下のプライマーを使用した。

実施例2 (P309R)用Primers:

R(Fwd); 5' - GGGATGCGCTGGACCGAGATCGACTAC -3' (配列番号29)

R(Rev); 5' - GGTCCAGCGCATCCCGAGATAGAGGGA -3' (配列番号30)

【0114】

実施例3 (P309S)用Primers:

S(Fwd); 5' - GGGATGTCTGGACCGAGATCGACTAC -3' (配列番号31)

S(Rev); 5' - GGTCCAGGACATCCCGAGATAGAGGGA -3' (配列番号32)

【0115】

実施例4 (P309M)用Primers:

M(Fwd); 5' - GGGATGATGTGGACCGAGATCGACTAC -3' (配列番号33)

M(Rev); 5' - GGTCCACATCATCCCGAGATAGAGGGA -3' (配列番号34)

【0116】

実施例5 (P309V)用Primers:

V(Fwd); 5' - GGGATGGTGTGGACCGAGATCGACTAC -3' (配列番号35)

V(Rev); 5' - GGTCCACACCATCCCGAGATAGAGGGA -3' (配列番号36)

【0117】

実施例6 (P309Q)用Primers:

Q(Fwd); 5' - GGGATGCAGTGGACCGAGATCGACTAC -3' (配列番号37)

Q(Rev); 5' - GGTCCACTGCATCCCGAGATAGAGGGA -3' (配列番号38)

【0118】

比較例2 (P309A)用Primers:

A (Fwd); 5' - GGGATGGCATGGACCGAGATCGACTAC -3' (配列番号39)

A (Rev); 5' - GGTCCATGCCATCCCGAGATAGAGGGA -3' (配列番号40)

【0119】

比較例3 (P309F)用Primers:

F(Fwd); 5' - GGGATGTTCTGGACCGAGATCGACTAC -3' (配列番号41)

F(Rev); 5' - GGTCCAGAACATCCCGAGATAGAGGGA -3' (配列番号42)

【0120】

PCRサイクル:

デナチュレーション過程: 98 10秒

アニーリング過程: 98 15秒

エクステンション過程: 72 40秒

以上を1サイクルとして、30サイクル行った。

【0121】

上記で生成した反応液5  $\mu$ lを0.8%アガロースゲルにより電気泳動を行い、約2.7-kbのDNA断片が検出された。

【0122】

上記のPCR反応液を、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  $\mu$ g/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、及び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、エンテロバクター クロアカエ株由来dec/ECL(P309部位変異体)遺伝子の長さ約2.3-kbの挿入断片が認められた。

10

20

30

40

50

また、DNAシーケンスによって、目的とする変異が導入されていることを確認した。

【0123】

アニリン生産遺伝子導入株の構築

上述のプラスミドpCRB209-dec/ECL(野生型、及びP309における各変異体)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/ECL変異体の導入が認められた。

10

【0124】

pCRB209-dec/ECL(P309A変異体)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-8と命名した。

pCRB209-dec/ECL(P309F変異体)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-9と命名した。

pCRB209-dec/ECL(P309T変異体)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-10と命名した。

pCRB209-dec/ECL(P309R変異体)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-11と命名した。

pCRB209-dec/ECL(P309S変異体)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-12と命名した。

20

pCRB209-dec/ECL(P309M変異体)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-13と命名した。

pCRB209-dec/ECL(P309V変異体)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-14と命名した。

pCRB209-dec/ECL(P309Q変異体)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-15と命名した。

【0125】

コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) ANI-13、ANI-14及びANI-15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:2013年4月2日、受託番号:NITE P-01583、NITE P-01584及びNITE P-01585)。またこれらについて、同センターにブタペスト条約に基づく国際寄託への移管を申請し、移管が完了している(国際受託番号:NITE BP-01583、NITE BP-01584及びNITE BP-01585)。

30

また、コリネバクテリウム グルタミカム R (Corynebacterium glutamicum R)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 特許生物寄託センターに寄託した(受託日:2002年8月20日、受託番号:FERM P-18976)。またこれについて、同センターにブタペスト条約に基づく国際寄託への移管を申請し、移管が完了している(国際受託番号:FERM BP-18976)。

【0126】

40

アミノベンゾエート デカルボキシラーゼの3つのサブユニット(21.7 kDa, 52.5 kDa, 8.6 kDa)のうち、52.5 kDaサブユニット中のN末端から309番目のプロリンがアラニンに置換されたものを比較例2とし、該N末端から309番目のプロリンがフェニルアラニンに置換されたものを比較例3とした。該N末端から309番目のプロリンがスレオニンに置換されたものを実施例1とした。該N末端から309番目のプロリンがアルギニンに置換されたものを実施例2とした。該N末端から309番目のプロリンがセリンに置換されたものを実施例3とした。該N末端から309番目のプロリンがメチオニンに置換されたものを実施例4とした。該N末端から309番目のプロリンがバリンに置換されたものを実施例5とした。該N末端から309番目のプロリンがグルタミンに置換されたものを実施例6とした。

50

## 【 0 1 2 7 】

[ 比較例 4 ] 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製造( 1 ) 好気培養

製造例 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-7株 (野生型、比較例 1) を、カナマイシン50 µg/ml を含む A 寒天培地 [(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO 2g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5g, 0.06% (w/v) Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O + 0.042% (w/v) MnSO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 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、カナマイシンを終濃度が50 µg/mlとなるように添加]に塗布し、33、15時間暗所に静置した。

10

## 【 0 1 2 8 】

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-7株を、カナマイシン50 µg/mlを含む A 液体培地 [(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO 2 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5 g, 0.06% (w/v) Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O + 0.042% (w/v) MnSO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 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を蒸留水1Lに溶解] 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 (前培養)。

上記条件で生育したコリネバクテリウム グルタミカムANI-7株を、A 液体培地 10 ml に初期菌体濃度 OD<sub>610</sub> = 0.1 となるように植菌し、33にて好氣的に振とう培養を行った。

20

## 【 0 1 2 9 】

( 2 ) アニリン製造実験

このようにして培養増殖された菌体は、遠心分離 (4、15,000 × g、10分) により回収した。得られた菌体を、5 ml の新たな B T 液体培地 [(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO 2g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5g, 0.06% (w/v) Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O + 0.042% (w/v) MnSO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 1 ml, 0.02% (w/v) biotin solution 1 ml, 0.01%(w/v) thiamin solution 2 ml を蒸留水1Lに溶解]を加えて懸濁後、再度遠心分離して (4、15000 × g、10分) 洗浄し、再度新たな B T 液体培地を加えて菌体を懸濁した。反応溶液中の最終濃度が以下の条件になるように、MESバッファー (pH 6.0)、基質(4-アミノ安息香酸 Na塩)、B T 培地を添加し、33 に保った水浴中で攪拌しながら下記の反応液組成と反応条件にて反応を行った。

30

反応液組成：

100 mM 4 - アミノ安息香酸 Na 塩

100 mM MES バッファー (pH 6.0)

遺伝子組み換え型コリネバクテリウム グルタミカム (コリネ型細菌) 最終 OD<sub>610</sub> 値 = 2.5

B T 培地

ここで、OD<sub>610</sub>値は菌体密度を示しており、値が大きいほど菌体密度が高いことを示す。

40

## 【 0 1 3 0 】

反応条件：

温度：33、

反応容器：ファルコンチューブ(15 mL)、

還元条件下 (酸化還元電位； -450 mV)

攪拌速度：125 rpm

## 【 0 1 3 1 】

上記と同様に、比較例 2 及び 3 のサンプルについても、反応を行った。

## 【 0 1 3 2 】

50

## (3) 反応生成物解析

嫌気反応開始から、24時間及び48時間後に、反応溶液を1mL採取した。反応溶液は、遠心分離によりコリネバクテリウム グルタミカムを除去した後、上清を0.22µmフィルターに通したものを試料としてHPLCによって生成物の分析を行った。結果を、下記表1に示す。

【0133】

[実施例7] 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製造

実施例1～6のサンプルについて、比較例4と同様の条件で、アニリンを製造した。結果を、下記表1に示す。

【0134】

【表1】

サンプル	配列情報	組換え体名称	OD <sub>610</sub>	24時間後の アニリンの生成量 (mM)	48時間後の アニリンの生成量 (mM)
比較例1	野生型	ANI-7	2.5	1.6	2.2
比較例2	P309A	ANI-8	2.5	1.0	1.4
比較例3	P309F	ANI-9	2.5	0.8	1.2
実施例1	P309T	ANI-10	2.5	2.2	3.0
実施例2	P309R	ANI-11	2.5	2.7	3.3
実施例3	P309S	ANI-12	2.5	2.2	3.6
実施例4	P309M	ANI-13	2.5	3.5	4.9
実施例5	P309V	ANI-14	2.5	3.1	5.1
実施例6	P309Q	ANI-15	2.5	3.8	5.5

(表中、P309Aは、N末端から309番目のプロリンがアラニンに置換されたことを意味し、P309Fは、N末端から309番目のプロリンがフェニルアラニンに置換されたことを意味し、P309Tは、N末端から309番目のプロリンがスレオニンに置換されたことを意味し、P309Rは、N末端から309番目のプロリンがアルギニンに置換されたことを意味し、P309Sは、N末端から309番目のプロリンがセリンに置換されたことを意味し、P309Mは、N末端から309番目のプロリンがメチオニンに置換されたことを意味し、P309Vは、N末端から309番目のプロリンがバリンに置換されたことを意味し、P309Qは、N末端から309番目のプロリンがグルタミンに置換されたことを意味する。)

【0135】

実施例1は、野生型(比較例1)と比較して、より高いアニリン生産性を示した。また、アラニン(比較例2)、フェニルアラニン(比較例3)に置換した場合は、実施例1と比べてアニリン生産性が低下した。一方、アルギニン(実施例2)、セリン(実施例3)、メチオニン(実施例4)、バリン(実施例5)、グルタミン(実施例6)に置換した場合、実施例1と比較して、より高いアニリン生産性を示した(一方、遺伝子を導入していない、コリネバクテリウム グルタミカム(宿主)は同条件では全くアニリンを生成しないことを確認した。他方、アニリンの分解も認められなかった。)

【0136】

[比較例5] 菌体密度を増大させた場合のアニリン製造

## (1) 好気培養

野生型(比較例1)を用いて、好気培養は比較例4と同様に行った。

## (2) アニリン製造実験

好気培養で培養増殖された菌体を、遠心分離(4、15,000×g、10分)により回収した。得られた菌体を、5mLの新たなBT液体培地を加えて懸濁後、再度遠心分離して(4、15,000×g、10分)、洗浄した。再度、新たなBT液体培地を加えて懸濁後、再度遠心分離して(4、15000×g、10分)洗浄し、再度新たなBT液体培地を加えて菌体を懸濁した。

10

20

30

40

50

反応溶液中の最終濃度が以下の条件になるように、MESバッファー (pH 6.0)、基質(4-アミノ安息香酸 Na塩)、BT培地を添加し、33 に保った水浴中で攪拌しながら下記の反応液組成と反応条件にて反応を行った。

反応液組成：

100 mM 4-アミノ安息香酸 Na塩

100 mM MESバッファー (pH 6.0)

遺伝子組み換え型コリネバクテリウム グルタミカム (コリネ型細菌) 最終OD<sub>610</sub>値 = 150

BT培地

ここで、OD<sub>610</sub>値は菌体密度を示しており、値が大きいほど菌体密度が高いことを示す。

【0137】

反応条件：

温度：33℃

反応容器：ファルコンチューブ(15 mL)、

還元条件下 (酸化還元電位； -450 mV)

攪拌速度：125 rpm

【0138】

(3) 反応生成物解析

嫌気反応開始から48時間後に、反応溶液を0.2 mL採取した。反応溶液は、遠心分離によりコリネバクテリウム グルタミカムを除去した後、上清を0.22 μmフィルターに通したものを試料としてHPLCによって生成物の分析を行った。結果を、下記表2に示す。

【0139】

[実施例8] 菌体密度を増大させた場合のアニリン製造

実施例4～6のサンプルについて、比較例5と同様の条件で、アニリンを製造した。結果を、下記表2に示す。

【0140】

【表2】

サンプル	配列情報	組換え体名称	OD <sub>610</sub>	48時間後の アニリンの生成量 (mM)
比較例1	野生型	ANI-7	150	18.4
実施例4	P309M	ANI-13	150	31.5
実施例5	P309V	ANI-14	150	34.2
実施例6	P309Q	ANI-15	150	28.8

【0141】

エンテロバクター クロアカエ由来アミノベンゾエート デカルボキシラーゼの野生型をコードする遺伝子を宿主のコリネバクテリウム グルタミカムに導入した。菌体密度を比較例4の6倍に増大させてアニリンの生成を検討したところ、高いアニリン生産性を示した。

【0142】

アミノ安息香酸デカルボキシラーゼの52.5 kDaサブユニット中のN末端から309番目のアミノ酸を、メチオニン(実施例4)、バリン(実施例5)、グルタミン(実施例6)にそれぞれ置換した部位特異的変異導入酵素をコードする遺伝子を宿主のコリネバクテリウム グルタミカムに導入して、比較例5同様、菌体密度を実施例7と比較してそれぞれ6倍に増大させてアニリン生産性を調べた。各変異体は、実施例7の表1に比べて、それぞれ、さらに高いアニリン生産性を示した。

【0143】

[試験例1]

エシェリヒア コリとコリネバクテリウム グルタミカムについて、以下の方法で、ア

10

20

30

40

50



ニリン存在下における増殖への影響を評価した。

(1) エシェリヒア コリ

エシェリヒア コリについて、好気培養におけるアニリンの生育阻害実験を行った。エシェリヒア コリHST02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。

上記プレートで生育したエシェリヒア コリHST02株を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]10 mlの入った試験管に一白金耳植菌し、37にて13時間、好氣的に振とう培養を行った。

【0144】

上記培養条件で生育したエシェリヒア コリHST02株をLB液体培地100 mlに初期菌体濃度 $OD_{610} = 0.1$ となるように植菌し、同時にアニリン濃度が終濃度0, 20, 40, 60, 80 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。菌体の生育は、 $OD_{610}$ の吸光度を測定することにより行った。培地中へのアニリン添加による好気増殖への影響の解析結果を図2に示す。図2の縦軸は $OD_{610}$ である。

【0145】

エシェリヒア コリHST02株は、20 mMアニリン存在下で著しく阻害を受け、40 mMでは顕著に増殖が阻害された。

【0146】

(2) コリネバクテリウム グルタミカム

コリネバクテリウム グルタミカム R株をA寒天培地[(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO 2 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5 g, 0.06% (w/v) Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O + 0.042% (w/v) MnSO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 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、15時間暗所に静置した。

上記のプレート上で生育したコリネバクテリウム グルタミカム R株をA液体培地[(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO 2 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5 g, 0.06% (w/v) Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O + 0.042% (w/v) MnSO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 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を蒸留水1Lに溶解]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。

上記条件で生育したコリネバクテリウム グルタミカム R株を、A液体培地10 mlに初期菌体濃度 $OD_{610} = 0.1$ となるように植菌し、同時にアニリンが終濃度0, 20, 40, 60, 80 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。菌体の生育は、 $OD_{610}$ の吸光度を測定することにより行った。

【0147】

培地中へのアニリン添加による好気増殖への影響の解析結果を図3に示す。図3の縦軸は $OD_{610}$ である。

【0148】

コリネバクテリウム グルタミカムは、エシェリヒア コリHST02株が顕著な増殖阻害を受けた40 mMアニリン存在下においても増殖への影響はほとんどなく、エシェリヒア コリHST02株では完全に増殖が阻害された60 mMのアニリン存在下でも生育可能であった。このように、コリネバクテリウム グルタミカムは、エシェリヒア コリと比較して、アニリンに対して高い耐性を示し、アニリン生産の宿主として高い適性を有することが示された。

【0149】

上記のように、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の3つのサブユニット21.7 kDa (配列番号43で表されるアミノ酸配列から構成される)、52.5 kDa (配列番号2で表されるアミノ酸配列から構成される)、8.6 kDa (配列番号44で表されるアミノ酸配列から構成される)のうち、配列番号2で表されるアミノ酸配列から構成される52.5 kDaサブユニット中のN末端から309番目のプロリンに変異を導入した本発明の形

10

20

30

40

50

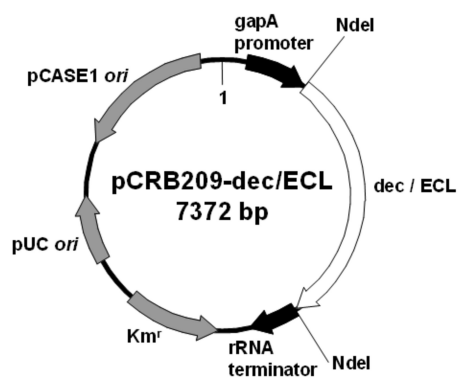
質転換体は、優れたアニリン生産能を有する。

【産業上の利用可能性】

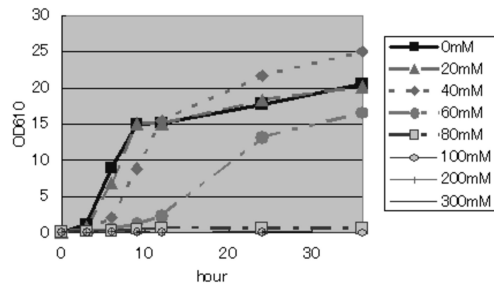
【0150】

本発明によれば、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。

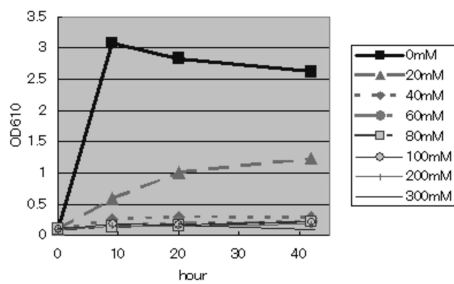
【図1】



【図3】



【図2】



【配列表】

0006294309000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
C 1 2 P 13/00  
C 1 2 R 1:15

特許法第30条第2項適用 平成25年3月26日東北大学において開催された公益社団法人日本農芸化学会2013年度大会で発表。

微生物の受託番号 IPOD FERM BP-18976

微生物の受託番号 NPMD NITE BP-01583

微生物の受託番号 NPMD NITE BP-01584

微生物の受託番号 NPMD NITE BP-01585

(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

(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

審査官 白井 美香保

(56)参考文献 国際公開第2012/090978(WO, A1)

特表2005-507259(JP, A)

特開2001-333784(JP, A)

特開2008-274225(JP, A)

J. Appl. Glycosci., 2005年, vol.52, pp.137-143

井上正之, パイオ・アニリンの合成 - 固定化パン酵母によるニトロベンゼンの還元 -, 化学と教育, 1991年, Vol. 39, No. 5, pp. 572-573

J. Biol. Chem., 1951年, vol.193, pp.453-458

J. Am. Chem. Soc., 1957年, vol.79 no.3, pp.628-630

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 P 1 / 0 0 - 4 1 / 0 0

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

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

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

R E G I S T R Y ( S T N )

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

P u b M e d

C i N i i