

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6620375号  
(P6620375)

(45) 発行日 令和1年12月18日(2019.12.18)

(24) 登録日 令和1年11月29日(2019.11.29)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N 15/81	(2006.01)	C 1 2 N 15/81	Z
C 1 2 N 1/19	(2006.01)	C 1 2 N 1/19	Z N A
C 1 2 P 7/56	(2006.01)	C 1 2 P 7/56	

請求項の数 10 (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2016-553124 (P2016-553124)	(73) 特許権者	516149893 J M T C エンザイム株式会社 東京都中央区銀座八丁目17番5号
(86) (22) 出願日	平成27年10月6日 (2015.10.6)	(74) 代理人	100106909 弁理士 棚井 澄雄
(86) 国際出願番号	PCT/JP2015/078394	(74) 代理人	100064908 弁理士 志賀 正武
(87) 国際公開番号	W02016/056566	(74) 代理人	100094400 弁理士 鈴木 三義
(87) 国際公開日	平成28年4月14日 (2016.4.14)	(74) 代理人	100106057 弁理士 柳井 則子
審査請求日	平成30年7月13日 (2018.7.13)	(72) 発明者	原 太志 東京都千代田区丸の内一丁目5番1号 旭 硝子株式会社内
(31) 優先権主張番号	特願2014-209048 (P2014-209048)		
(32) 優先日	平成26年10月10日 (2014.10.10)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 形質転換体およびその製造方法、ならびに乳酸の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

シゾサッカロミセス・ポンベを宿主とし、ヒト由来の乳酸脱水素酵素遺伝子が3コピー組み込まれ、かつ前記シゾサッカロミセス・ポンベ宿主のピルビン酸脱炭酸酵素2をコードする遺伝子が欠失または失活している、形質転換体。

【請求項2】

前記乳酸脱水素酵素遺伝子がシゾサッカロミセス・ポンベの染色体に組み込まれている、請求項1に記載の形質転換体。

【請求項3】

500mL容の坂口フラスコに入った、イーストエクストラクト1%、ペプトン2%、およびグルコース6%からなる液体培地100mLに初発菌体濃度を0.04g(乾燥菌体換算)/Lになるように菌体を接種し、温度32℃、110rpmかつ振り幅7cmの振盪条件下で20時間培養した培養液の菌体濃度が4.0g(乾燥菌体換算)/L以上であり、

500mL容の坂口フラスコに入った、イーストエクストラクト1%、ペプトン2%、およびグルコース6%からなる液体培地100mLに初発菌体濃度を0.04g(乾燥菌体換算)/Lになるように菌体を接種し、温度32℃、110rpmかつ振り幅7cmの振盪条件下で20時間培養し得られた菌体を、直径18mmかつ長さ150mmの試験管に入った4.5mLの11.1%グルコース水溶液に初発菌体濃度が36g(乾燥菌体換算)/Lになるように接種し、温度32℃、仰角43.5°、110rpm、およびふり

10

20

幅7cmの振盪条件下で3時間発酵させた発酵液の乳酸濃度が80g/L以上である、請求項1又は2に記載の形質転換体。

【請求項4】

シゾサッカロミセス・ポンベを宿主とし、シゾサッカロミセス・ポンベ内で機能するプロモーターとターミネーターとヒト由来の乳酸脱水素酵素遺伝子とを含む発現カセットを、前記宿主の染色体中の1~3箇所に導入した形質転換体を得ること、および、

前記宿主としてピルビン酸脱炭酸酵素2をコードする遺伝子が欠失または失活した宿主を用いるか、または前記得られた形質転換体のピルビン酸脱炭酸酵素2をコードする遺伝子を欠失または失活させること

を特徴とする、ヒト由来の乳酸脱水素酵素遺伝子が3コピー組み込まれかつピルビン酸脱炭酸酵素2をコードする遺伝子が欠失または失活している形質転換体の製造方法。

10

【請求項5】

前記発現カセットを、シゾサッカロミセス・ポンベの染色体中のeno101遺伝子座上流10000bpから下流10000bpの領域、leu1遺伝子座上流10000bpから下流10000bpの領域、およびgpm1遺伝子座上流10000bpから下流10000bpの領域から選ばれる領域に導入する、請求項4に記載の形質転換体の製造方法。

【請求項6】

請求項1~3のいずれか一項に記載の形質転換体を培養液中で培養し、該培養液から乳酸を取得する乳酸の製造方法。

20

【請求項7】

濃度1~50質量%のグルコースを含む培養液を使用して培養を行う、請求項6に記載の乳酸の製造方法。

【請求項8】

前記形質転換体により産生される乳酸により、前記培養液のpHが3.5以下になった後にさらに培養を継続する、請求項6または7に記載の乳酸の製造方法。

【請求項9】

前記形質転換体により産生された培養液中の乳酸を中和することなく培養を継続する、請求項6~8のいずれか一項に記載の乳酸の製造方法。

【請求項10】

前記形質転換体により産生された培養液中の乳酸を中和することなく、培養液から乳酸を分離する、請求項6~9のいずれか一項に記載の乳酸の製造方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、形質転換体およびその製造方法、ならびに乳酸の製造方法に関する。より詳細には、シゾサッカロミセス・ポンベ(Schizosaccharomyces pombe)(以下、S.ポンベともいう)に、乳酸脱水素酵素遺伝子(乳酸脱水素酵素(LDH))をコードする遺伝子、以下「LDH遺伝子」ともいう。)を組み込み、かつピルビン酸脱炭酸酵素をコードする遺伝子群の一部の遺伝子を欠失または失活させた形質転換体、該形質転換体の製造方法、および該形質転換体を培養液中で培養し、該培養液から乳酸を取得する乳酸の製造方法に関する。

40

【背景技術】

【0002】

乳酸は食品用途、医療、化粧品等の化学原料用途に広く用いられている。また、乳酸を用いて得られるポリ乳酸は、微生物等により最終的に二酸化炭素と水にまで分解される生分解性プラスチックとして注目されている。そのため、乳酸を安価に高い生産性で製造することが必要である。

【0003】

乳酸の製造方法としては、乳酸菌により糖を発酵させ製造する生物学的方法が知られて

50

いる。しかし、乳酸菌は耐酸性が低いいため、該方法で高い生産性を得るには発酵により産生される乳酸をアルカリにより中和して乳酸塩とする必要がある。このようなアルカリによる中和は、乳酸塩から乳酸に戻す工程が必要となるため、製造工程が煩雑になり製造コストも高くなる。

【0004】

アルカリによる中和を行わずに乳酸を得る方法としては、酵母にLDHをコードする遺伝子を導入した形質転換体を用いる方法がある。たとえば特許文献1には、S.ポンベに、ヒト由来等の哺乳動物由来のLDH遺伝子が組み込まれ、かつS.ポンベ宿主のピルビン酸脱炭酸酵素をコードする遺伝子群の一部の遺伝子を欠失または失活させた形質転換体を培養することにより、アルカリによる中和工程を行わずに高い生産性で乳酸を製造し得ることが開示されている。また、特許文献2には、培養培地中で培養した際に本質的にエタノールを産生しないサッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) に、ラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*) のL-乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を導入した形質転換体を培養することによりL-乳酸が得られることが開示されている。

10

【0005】

さらに、特許文献3には、S.ポンベを宿主とし、ラクトバチルス・ペントーサス (*Lactobacillus pentosus*) のLDH遺伝子 (LpLDH遺伝子) が組み込まれ、かつ前記S.ポンベ宿主のピルビン酸脱炭酸酵素をコードする遺伝子群の一部の遺伝子が欠失または失活している形質転換体も、特許文献1に記載の形質転換体と同程度またはそれ以上の乳酸生産性を有すること、特に、LpLDH遺伝子とヒト由来のLDH遺伝子 (HsLDH遺伝子) を組み合わせて組み込むことにより、HsLDH遺伝子を1コピー組み込んだ形質転換体およびHsLDH遺伝子と他の生物種由来のLDH遺伝子を1コピーずつ組み込んだ形質転換体よりも、顕著に乳酸産生能が向上することが開示されている。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】国際公開第2011/021629号

【特許文献2】特表2007-512018号公報

【特許文献3】国際公開第2014/030655号

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

より効率よく乳酸を産生するためには、乳酸産生能と増殖能の両方が優れた形質転換体が好ましい。しかし、後記例1に示すように、一般的に、外来のLDH遺伝子を導入した変異株は、乳酸産生能が高い株ほど増殖能が低い傾向がある。

【0008】

そこで本発明では、アルカリによる中和を必要とせず高い生産性で乳酸を産生でき、かつ乳酸産生能と増殖能の両方に優れたS.ポンベの形質転換体および該形質転換体の製造方法を目的とする。

40

また、前記形質転換体を用いて、アルカリによる中和工程を行わずに高い生産性で乳酸を製造する方法を目的とする。

なお、本発明において乳酸とは生物学的方法で得られるL-乳酸をいう。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明に係る第1の形質転換体は、シゾサッカロミセス・ポンベを宿主とし、ヒト由来のLDH遺伝子が3コピー組み込まれ、かつ前記シゾサッカロミセス・ポンベ宿主のピルビン酸脱炭酸酵素2をコードする遺伝子が欠失または失活している。

【0011】

50

本発明に係る第1の形質転換体においては、前記LDH遺伝子はシゾサッカロミセス・ポンベの染色体に組み込まれていることが好ましい。

【0012】

また、本発明に係る形質転換体の製造方法は、シゾサッカロミセス・ポンベを宿主とし、シゾサッカロミセス・ポンベ内で機能するプロモーターとターミネーターとヒト由来の乳酸脱水素酵素遺伝子とを含む発現カセットを、前記宿主の染色体中の1~3箇所に導入した形質転換体を得ること、および、前記宿主としてピルビン酸脱炭酸酵素2をコードする遺伝子が欠失または失活した宿主を用いるかまたは前記得られた形質転換体のピルビン酸脱炭酸酵素2をコードする遺伝子を欠失または失活させる、ヒト由来の乳酸脱水素酵素遺伝子が3コピー組み込まれかつピルビン酸脱炭酸酵素2をコードする遺伝子が欠失または失活している形質転換体を製造する方法である。

10

本発明に係る形質転換体の製造方法においては、前記発現カセットを、シゾサッカロミセス・ポンベの染色体中のeno101遺伝子座上流10000bpから下流10000bpの領域、leu1遺伝子座上流10000bpから下流10000bpの領域、およびgpm1遺伝子座上流10000bpから下流10000bpの領域から選ばれる領域に導入することが好ましい。

【0013】

さらに、本発明に係る乳酸の製造方法は、前記形質転換体を培養液中で培養し、該培養液から乳酸を取得する。

本発明に係る乳酸の製造方法において、濃度1~50質量%のグルコースを含む培養液を使用して培養を行うことが好ましい。また、前記形質転換体により産生される乳酸により、前記培養液のpHが3.5以下になった後にさらに培養を継続することが好ましい。

20

さらに、前記形質転換体により産生された培養液中の乳酸を中和することなく培養を継続することが好ましく、また、培養液中の乳酸を中和することなく培養液から乳酸を分離することが好ましい。

【発明の効果】

【0014】

本発明に係るS・ポンベの形質転換体は、増殖能に優れている上に、アルカリによる中和を必要とせず高い生産性で乳酸を産生できる。また、高濃度の糖、特にグルコース、フルクトース、スクロース、またはマルトースの存在下での乳酸産生に適し、かつ高密度培養にも適している。さらに、高酸素条件下における長期にわたる連続培養における乳酸産生能も高い。

30

前記形質転換体は、本発明に係る形質転換体の製造方法により簡便に得ることができる。

また、本発明に係る乳酸の製造方法は、アルカリによる中和工程を行わずに高い生産性で乳酸を製造できる。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】組換えベクターpSM-HsLDHベクターの構造の模式図である。

【図2】組換えベクターpSN-HsLDHベクターの構造の模式図である。

40

【図3】例1における各形質転換体の発酵3時間後の乳酸濃度(g/L)(縦軸)と培養20時間後の培養液の菌体濃度(g(乾燥菌体換算(dcw))/L)(横軸)を示した分散図である。

【図4】例2における各形質転換体の60時間培養後の培養液のOD<sub>660</sub>と3時間発酵後の発酵液の乳酸濃度(g/L)の測定結果を示した図である。

【図5】例3における各形質転換体の連続発酵における発酵液中の乳酸濃度(g/L)の経時変化を示した図である。

【発明を実施するための形態】

【0016】

[形質転換体]

50

本発明に係る第1の形質転換体は、*S. ポンベ*を宿主とし、ヒト由来の乳酸脱水素酵素遺伝子が3～5コピー組み込まれ、かつ前記シゾサッカロミセス・ポンベ宿主のピルビン酸脱炭酸酵素をコードする遺伝子群の一部の遺伝子が欠失または失活していることを特徴とする。本発明に係る第1の形質転換体は、乳酸産生能が高いにもかかわらず、増殖能も十分に高い。このため、工業上の乳酸を量産するための乳酸産生菌として非常に好適である。

上記欠失または失活しているピルビン酸脱炭酸酵素をコードする遺伝子はPDC2遺伝子であることが好ましい。さらに、上記LDH遺伝子はシゾサッカロミセス・ポンベの染色体に組み込まれていることが好ましい。

#### 【0017】

本発明に係る第2の形質転換体は、500mL容の坂口フラスコに入った、イーストエクストラクト1%、ペプトン2%、およびグルコース6%からなる液体培地100mLに初発菌体濃度を0.04g(乾燥菌体換算)/Lになるように菌体を接種し、温度32、110rpmかつ振り幅7cmの振盪条件下で20時間培養した培養液の菌体濃度が4.0g(乾燥菌体換算)/L以上であり、500mL容の坂口フラスコに入った、イーストエクストラクト1%、ペプトン2%、およびグルコース6%からなる液体培地100mLに初発菌体濃度を0.04g(乾燥菌体換算)/Lになるように菌体を接種し、温度32、110rpmかつ振り幅7cmの振盪条件下で20時間培養し得られた菌体を、直径18mmかつ長さ150mmの試験管に入った4.5mLの11.1%グルコース水溶液に初発菌体濃度が36g(乾燥菌体換算)/Lになるように接種し、温度32、仰角43.5°、110rpm、および振り幅7cmの振盪条件下で3時間発酵させた発酵液の乳酸濃度が80g/L以上であることを特徴とする。本発明に係る第2の形質転換体は、上記のように、乳酸産生能が高いにもかかわらず、増殖能も十分に高い。このため、工業上の乳酸を量産するための乳酸産生菌として非常に好適である。

#### 【0018】

本発明に係る第2の形質転換体としては、*S. ポンベ*を宿主とし、LDH遺伝子が組み込まれ、かつ*S. ポンベ*宿主のピルビン酸脱炭酸酵素をコードする遺伝子群の一部の遺伝子が欠失または失活している、形質転換体が好ましい。このような形質転換体としては、前記第1の形質転換体が特に好ましい。

#### 【0019】

<*S. ポンベ*>

宿主である*S. ポンベ*は、シゾサッカロミセス属に属する酵母(分裂酵母)であり、他の酵母に比べて特に耐酸性に優れる微生物である。また、*S. ポンベ*は、サッカロミセス・セレビスエ等の他の酵母に比べ、高濃度のグルコース下における乳酸の生産性に優れ、高密度培養(大量の酵母を用いた培養)にも適していることがわかった。そのため、*S. ポンベ*の形質転換体を用いることにより、極めて高い生産性で乳酸を製造できる。

なお、*S. ポンベ*の染色体の全塩基配列は、データベース「Pombase (<http://www.pombase.org/>)」に、収録され、公開されている。本明細書記載の*S. ポンベ*の遺伝子の配列データは前記データベースから遺伝子名または前記系統名で検索して、入手できる。

#### 【0020】

<ピルビン酸脱炭酸酵素をコードする遺伝子>

*S. ポンベ*におけるピルビン酸脱炭酸酵素をコードする遺伝子(ピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子、以下「PDC遺伝子」ともいう。)群には、ピルビン酸脱炭酸酵素1をコードする遺伝子(以下、「PDC1遺伝子」という。)、ピルビン酸脱炭酸酵素2をコードする遺伝子(以下、「PDC2遺伝子」という。)、ピルビン酸脱炭酸酵素3をコードする遺伝子(以下、「PDC3遺伝子」という。)、ピルビン酸脱炭酸酵素4をコードする遺伝子(以下、「PDC4遺伝子」という。)の4種類がある。なかでも、*S. ポンベ*においては、PDC2遺伝子とPDC4遺伝子が主要な機能を持つPDC遺伝子である。各PDC遺伝子の系統名は以下の通りである。

PDC1遺伝子(Pdc1); SPAC13A11.06

10

20

30

40

50

PDC2 遺伝子 (Pdc2) ; SPAC1F8.07c

PDC3 遺伝子 (Pdc3) ; SPAC186.09

PDC4 遺伝子 (Pdc4) ; SPAC3G9.11c

前記 PDC 遺伝子の配列データは、前記 S. ポンベ 遺伝子データベースから遺伝子名または系統名で検索して入手できる。

#### 【0021】

野生型 S. ポンベでは、解糖系によりグルコースをピルビン酸まで代謝し、前述の PDC 遺伝子から発現されるピルビン酸脱炭酸酵素によりピルビン酸がアセトアルデヒドに変換され、次いで該アセトアルデヒドがアルコール脱水素酵素によりエタノールへと変換されることでエタノール発酵が行われる。また、野生型 S. ポンベは機能を持った LDH 遺伝子を有していないことより、ピルビン酸から乳酸が生成するルートは存在しない。

10

一方、組み込まれた LDH 遺伝子から発現される LDH は、ピルビン酸を乳酸に還元することにより乳酸を産生させる。そのため、野生型 S. ポンベに LDH 遺伝子を組み込んで乳酸を産生できるようにしても、そのままではエタノール発酵と乳酸発酵の両方を行うことになるため、乳酸の生産性が十分に高くない。

#### 【0022】

本発明に係る形質転換体は、前記ピルビン酸脱炭酸酵素をコードする遺伝子群のうち、一部が欠失または失活した染色体を有する。形質転換体の PDC 遺伝子群の一部の遺伝子が欠失または失活していることにより、形質転換体のエタノール発酵の効率が低下し、エタノールに変換されるピルビン酸量が少なくなるため、乳酸の生産性が向上する。ただし、PDC 遺伝子群のすべての遺伝子を欠失または失活させると、エタノール発酵が全く行えなくなって生育が阻害されるため、欠失または失活させるのは PDC 遺伝子群の一部の遺伝子とする。

20

#### 【0023】

欠失または失活させる PDC 遺伝子は、PDC2 遺伝子であることが特に好ましい。PDC2 遺伝子は、特に主要な機能を持つ PDC 遺伝子である。

前述のように、PDC 遺伝子を全て欠失または失活させてしまうと、その形質転換体はエタノール発酵が行えなくなるために生育が阻害される。そのため、PDC 遺伝子の欠失または失活は、生育に必要なエタノール発酵能を残して十分な形質転換体量が得られるようにしつつ、エタノール発酵能を低下させて乳酸の発酵効率を向上させられるように行わなければならない。該課題に対して本発明者等が検討を行った結果、PDC2 遺伝子を欠失または失活させると PDC4 遺伝子がある程度活性化し、十分な形質転換体量が得られる程度のエタノール発酵能と、高い発酵効率での乳酸の生産が両立できることを見出した。

30

#### 【0024】

PDC 遺伝子の欠失または失活は、公知の方法で行うことができる。たとえば、Latour 法 (Nucleic Acids Res 誌、2006 年、34 巻、e11 頁、国際公開第 2007/063919 号パンフレット等に記載) を用いることにより PDC 遺伝子を欠失させることができる。

また、PDC 遺伝子の塩基配列の一部に欠失、挿入、置換、付加を起こすことにより、該 PDC 遺伝子を失活させることもできる。欠失、挿入、置換、付加による変異は、それらのいずれか 1 つのみを起こしてもよく、2 つ以上を起こしてもよい。

40

#### 【0025】

PDC 遺伝子の一部に前記変異を導入する方法は、公知の方法を用いることができる。たとえば、変異剤を用いた突然変異分離法 (酵母分子遺伝学実験法、1996 年、学会出版センター)、PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) を利用したランダム変異法 (ピーシーアル・メソックス・アプリケーション (PCR Methods Appl.)、1992 年、第 2 巻、p. 28 - 33.) が挙げられる。

#### 【0026】

また、一部に変異が導入された PDC 遺伝子は、温度感受性の変異型ピルビン酸脱炭酸

50

酵素を発現するものであってもよい。温度感受性の変異型ピルビン酸脱炭酸酵素とは、ある培養温度においては野生型のピルビン酸脱炭酸酵素と同等の活性を示すが、特定の培養温度以上になると活性の消失または低下が見られる酵素である。

該変異型ピルビン酸脱炭酸酵素を発現する突然変異株は、温度により活性が制限されない条件下では野生型酵母と同等の生育速度を示し、活性が制限される特定の温度条件下において生育速度が著しく低下するものを選択することで得ることができる。

#### 【0027】

<LDH遺伝子>

本発明に係る形質転換体は、少なくとも1のLDH遺伝子を有する。前記のように、S・ポンベは本来強い酵素活性を示すLDH遺伝子を有していない。したがって、S・ポンベ以外の生物のLDH遺伝子を遺伝子工学的な方法でS・ポンベに導入して形質転換体を得る。

10

#### 【0028】

本発明に係る第2の形質転換体に組み込まれるLDH遺伝子の生物種は特に限定されない。また、本発明に係る第2の形質転換体に組み込まれるLDH遺伝子は、1つであってもよく、2以上であってもよい。宿主に複数のLDH遺伝子を導入する場合、同じ生物種由来のLDH遺伝子を複数導入してもよく、異種の生物種由来のLDH遺伝子を適宜組み合わせ導入してもよい。宿主であるS・ポンベに導入するLDH遺伝子の生物種およびコピー数を適宜調整することにより、増殖能を過度に損なうことなく、乳酸産生能の高い形質転換体を得ることができる。

20

#### 【0029】

本発明に係る形質転換体としては、S・ポンベを宿主とし、HsLDH遺伝子(GenBank accession number: X02152.1)が3~5コピー組み込まれ、かつ前記S・ポンベ宿主のピルビン酸脱炭酸酵素をコードする遺伝子群の一部の遺伝子が欠失または失活しているもの(すなわち、前記第1の形質転換体)が好ましい。本発明に係る形質転換体が有するHsLDH遺伝子は、3~4コピーがより好ましく、3コピーが最も好ましい。後記例1に示すように、ピルビン酸脱炭酸酵素をコードする遺伝子群の一部の遺伝子が欠失または失活しているS・ポンベ宿主にさらにHsLDH遺伝子を2コピー導入した形質転換体は、該S・ポンベ宿主にHsLDH遺伝子を1コピー導入した形質転換体よりも、乳酸産生能が向上している一方で、増殖能はやや低下する。にもかかわらず、該S・ポンベ宿主にHsLDH遺伝子を3コピー導入した形質転換体では、増殖能はHsLDH遺伝子1コピー導入した形質転換体とほぼ変わらないが、乳酸産生能は顕著に高い。

30

#### 【0030】

[形質転換体の製造]

本発明に係る形質転換体は、PDC遺伝子群の一部の遺伝子が欠失または失活したS・ポンベを宿主とし、これにLDH遺伝子を遺伝子工学的な方法でS・ポンベに導入して得られる。また、PDC遺伝子群が欠失も失活もしていないS・ポンベを宿主とし、該S・ポンベにLDH遺伝子を遺伝子工学的な方法で導入して形質転換体を得て、その後得られた形質転換体のPDC遺伝子群の一部の遺伝子を欠失または失活させて、本発明に係る形質転換体を得ることもできる。後述の実施例では、前者の方法で目的の形質転換体を製造したが、後者の方法でもほぼ同等の形質転換体を製造できる。

40

#### 【0031】

以下、PDC遺伝子群の一部の遺伝子が欠失または失活したS・ポンベを宿主とし、これにHsLDH遺伝子3コピーを遺伝子工学的な方法で導入する方法を例に、形質転換体の製造方法を説明する。

#### 【0032】

<宿主>

宿主とするS・ポンベは、野生型であってもよく、用途に応じて特定の遺伝子を欠失または失活させた変異型であってもよい。特定の遺伝子を欠失または失活させる方法としては、公知の方法を用いられる。具体的には、Latour法(Nucleic Acids Research誌、第

50

34巻、e11ページ、2006年；国際公開第2007/063919号パンフレット等に記載)を用いることにより遺伝子を欠失させられる。また、変異剤を用いた突然変異分離法(酵母分子遺伝学実験法、1996年、学会出版センター)、PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)を利用したランダム変異法(PCR Methods Application誌、第2巻、28-33ページ、1992年)等により遺伝子の一部に変異を導入することにより該遺伝子を失活させられる。特定遺伝子を欠失または失活させたシゾサッカロミセス属酵母宿主としては、たとえば、国際公開第2002/101038号、国際公開第2007/015470号等に記載されている。

また、特定の遺伝子の削除または不活性化を行う部分はORF(オープンリーディングフレーム)部分であってもよく、発現調節配列部分であってもよい。特に好ましい方法は、構造遺伝子のORF部分をマーカー遺伝子に置換するPCR媒介相同組換え法(Yeast誌、第14巻、943-951ページ、1998年)による削除または不活性化の方法である。

#### 【0033】

PDC遺伝子が欠失または失活した変異体は、本発明に係る形質転換体を製造するための宿主として好ましく使用できる。さらに、PDC遺伝子以外にさらにPDC遺伝子以外の特定遺伝子を欠失または失活させたS.ポンベを宿主とすることもできる。プロテアーゼ遺伝子等を欠失または失活させることにより異種蛋白質の発現効率を高めることができ、本発明における宿主に適用することにより乳酸の生産効率の向上が期待できる。

#### 【0034】

さらに宿主として使用するS.ポンベには、形質転換体を選択するためのマーカーを有するものを用いることが好ましい。たとえば、ある遺伝子が欠落していることにより特定の栄養成分が生育に必須である宿主を使用することが好ましい。目的遺伝子配列を含むベクターにより形質転換をして形質転換体を作製する場合、ベクターに該欠落している遺伝子(栄養要求性相補マーカー)を組み込んでおくことにより、形質転換体では宿主の栄養要求性が消失する。該宿主と形質転換体の栄養要求性の相違により、両者を区別して形質転換体を得ることができる。

たとえば、オロチジンリン酸デカルボキシラーゼ遺伝子(ura4遺伝子)が欠失または失活してウラシル要求性となっているS.ポンベを宿主とし、ura4遺伝子(栄養要求性相補マーカー)を有するベクターにより形質転換した後、ウラシル要求性が消失したものを選択することにより、ベクターが組み込まれた形質転換体を得ることができる。宿主において欠落により栄養要求性となる遺伝子は、形質転換体の選択に用いられるものであればura4遺伝子には限定されず、イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子(leu1遺伝子)等であってもよい。

#### 【0035】

また、PDC遺伝子群が欠失も失活もしていないS.ポンベを形質転換体製造のための宿主として使用することもできる。この場合の宿主としては、PDC遺伝子以外の前記のような遺伝子(栄養要求性マーカーおよびプロテアーゼ遺伝子など)が欠失または失活しているものを使用できる。該宿主を用いて形質転換体を製造した後、得られた形質転換体のPDC遺伝子群の一部の遺伝子を欠失または失活させて、本発明に係る形質転換体を得ることができる。

#### 【0036】

<HsLDH遺伝子導入方法>

遺伝子工学的方法で宿主にHsLDH遺伝子を導入する方法としては、公知の方法を使用できる。S.ポンベを宿主としてこれに異種蛋白質の構造遺伝子を導入する方法としては、たとえば、特開平5-15380号公報、国際公開第95/09914号、特開平10-234375号公報、特開2000-262284号公報、特開2005-198612号公報、国際公開第2011/021629号などに記載の方法を使用できる。

#### 【0037】

<発現カセット>

発現カセットとは、目的の蛋白質を発現するために必要なDNAの組み合わせであり、

10

20

30

40

50

目的の蛋白質をコードする構造遺伝子と宿主内で機能するプロモーターとターミネーターを含む。本発明に係る形質転換体の製造において、H s L D H 遺伝子の発現カセットは、H s L D H 遺伝子とS . ポンペ内で機能するプロモーターとS . ポンペ内で機能するターミネーターを含む。該発現カセットは、5' - 非翻訳領域、3' - 非翻訳領域のいずれかが1つ以上が含まれていてもよい。さらに、前記栄養要求性相補マーカが含まれていてもよい。好ましい発現カセットは、H s L D H 遺伝子、プロモーター、ターミネーター、5' - 非翻訳領域、3' - 非翻訳領域、栄養要求性相補マーカを含む発現カセットである。1の発現カセットには複数のH s L D H 遺伝子が存在していてもよい。たとえば、1の発現カセット中に2 ~ 5個のH s L D H 遺伝子を含んでいてもよい。

【0038】

発現カセットに含めるH s L D H 遺伝子の遺伝子配列としては、野生型がコードする遺伝子をそのまま用いてもよいが、宿主として用いるS . ポンペ内での発現量を増大させるために、野生型の遺伝子配列を、S . ポンペにおいて使用頻度の高いコドンに改変してもよい。

【0039】

S . ポンペ内で機能するプロモーターとターミネーターは、本発明に係る形質転換体により乳酸が蓄積して酸性になっても(pH6以下になっても)、形質転換体内で機能してLDHの発現を維持できるものであればよい。S . ポンペ内で機能するプロモーターとしては、S . ポンペが本来有するプロモーター(転写開始活性が高いものが好ましい)またはS . ポンペが本来有しないプロモーター(ウイルス由来のプロモーターなど)を使用できる。なお、プロモーターはベクター内に2種以上存在していてもよい。

【0040】

S . ポンペが本来有するプロモーターとしては、たとえば、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子プロモーター、チアミンの代謝に関与するnmt1遺伝子プロモーター、グルコースの代謝に関与するフルクトース-1、6-ビスホスファターゼ遺伝子プロモーター、カタボライト抑制に関与するインペルターゼ遺伝子のプロモーター(国際公開第99/23223号パンフレット参照)、熱ショック蛋白質遺伝子プロモーター(国際公開第2007/26617号パンフレット参照)などが挙げられる。

S . ポンペが本来有しないプロモーターとしては、たとえば、特開平5-15380号公報、特開平7-163373号公報、特開平10-234375号公報に記載されている動物細胞ウイルス由来のプロモーターが挙げられ、hCMVプロモーター、SV40プロモーターが好ましい。

【0041】

S . ポンペ内で機能するターミネーターとしては、S . ポンペが本来有するターミネーターおよびS . ポンペが本来有しないターミネーターを使用できる。なお、ターミネーターはベクター内に2種以上存在していてもよい。

ターミネーターとしては、たとえば、特開平5-15380号公報、特開平7-163373号公報、特開平10-234375号公報に記載されているヒト由来のターミネーターが挙げられ、ヒト由来リポコルチンIのターミネーターが好ましい。

【0042】

<ベクター>

本発明に係る形質転換体は、H s L D H 遺伝子を含む発現カセットを、染色体中に有するか、または染色体外遺伝子として有する。発現カセットを染色体中に有するとは、宿主細胞の染色体中の1箇所以上に発現カセットが組み込まれていることであり、染色体外遺伝子として有するとは、発現カセットを含むプラスミドを細胞内に有することである。H s L D H 遺伝子を含む発現カセットを含む形質転換体は、H s L D H 遺伝子の発現カセットを含むベクターを用いて宿主であるS . ポンペを形質転換することにより得られる。

【0043】

該ベクターは、環状DNA構造または線状DNA構造を有するベクターに、該発現カセットを組み込むことにより製造できる。該発現カセットが、宿主の細胞内で染色体外遺伝

10

20

30

40

50

子として保持される形質転換体を作製する場合には、該ベクターは、宿主細胞内で複製されるための配列、即ち、自律複製配列 (Autonomously Replicating Sequence:ARS) を含むプラスミドであることが好ましい。一方で、該発現カセットが、宿主細胞の染色体中に組み込まれた形質転換体を作製する場合には、該ベクターは、線状DNA構造であり、かつARSを有していないものとして、宿主細胞へ導入されることが好ましい。たとえば、該ベクターは、線状DNAからなるベクターであってもよく、宿主への導入時に、線状DNAに切り開くための制限酵素認識配列を備える環状DNA構造のベクターであってもよい。該ベクターがARSを有するプラスミドの場合、ARS部分を削除して線状DNA構造、またはARS部分を開裂させることによりARSの機能を失活させた線状DNA構造とした後、宿主へ導入できる。

10

**【0044】**

該ベクターは、形質転換体を選択するためのマーカーを有することが好ましい。該マーカーとしては、たとえば、ura4 遺伝子 (栄養要求性相補マーカー)、イソプロピルリノゴ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (leu1 遺伝子) が挙げられる。

**【0045】**

HsLDH 遺伝子はS. ポンベの染色体に導入することが好ましい。染色体にHsLDH 遺伝子を導入することにより継代の維持安定性に優れた形質転換体を得られる。本発明に係る形質転換体のうち、HsLDH 遺伝子3~5コピーを有するものとしては、染色体中の1箇所に3~5個のHsLDH 遺伝子が導入されたものであってもよく、3~5箇所にそれぞれ1個ずつHsLDH 遺伝子が導入されたものであってもよい。

20

**【0046】**

染色体にHsLDH 遺伝子を導入する方法としては、公知の方法を使用できる。たとえば、前記特開2000-262284号公報に記載の方法で染色体にHsLDH 遺伝子を複数導入できる。また、該方法で染色体にHsLDH 遺伝子を1個導入することもできる。また、後述のように、染色体の複数の箇所に1個または複数のLDH 遺伝子を導入することもできる。

HsLDH 遺伝子をS. ポンベの染色体に導入する方法としては、HsLDH 遺伝子を有する発現カセットと組換え部位とを有するベクターを用い、相同組換え法により導入する方法が好ましい。

**【0047】**

ベクターの組換え部位は、S. ポンベの染色体における相同組換えの標的部位に対して相同組換えを行わせることのできる塩基配列を有する部位である。また、標的部位は、S. ポンベの染色体内で発現カセットを組み込む標的となる部位である。標的部位は、ベクターの組換え部位を該標的部位に対して相同組換えを行わせる塩基配列とすることにより自由に設定できる。

30

前記組換え部位の塩基配列と標的部位の塩基配列との相同性は70%以上とすることが必要である。また、組換え部位の塩基配列と標的部位の塩基配列との相同性は、相同組換えが起きやすくなる点から、90%以上とすることが好ましく、95%以上であることがより好ましい。該組換え部位を有するベクターを用いることにより、発現カセットが相同組換えにより標的部位に組み込まれる。

40

組換え部位の長さ(塩基数)は、20~2000bpであることが好ましい。組換え部位の長さが20bp以上であれば、相同組換えが起きやすくなる。また、組換え部位の長さが2000bp以下であれば、ベクターが長くなりすぎて相同組換えが起き難くなることを防ぎやすい。組換え部位の長さは100bp以上であることがより好ましく、200bp以上であることがさらに好ましい。また、組換え部位の長さは800bp以下であることがより好ましく、400bp以下であることがさらに好ましい。

**【0048】**

ベクターは、前記発現カセットと組換え部位以外に他のDNA領域を有していてもよい。たとえば、大腸菌内での複製のために必要な「ori」と呼ばれる複製開始領域、抗生物質耐性遺伝子(ネオマイシン耐性遺伝子等)が挙げられる。これらは大腸菌を使用して

50

ベクターを構築する場合に通常必要とされる遺伝子である。ただし、前記複製開始領域は後述のようにベクターを宿主の染色体に組み込む際には除去されることが好ましい。

【0049】

染色体にLDH遺伝子を組み込む場合、ベクターは、S. ポンベの細胞に導入する際には線状DNA構造で導入することが好ましい。すなわち、通常用いられるプラスミドDNA等の環状DNA構造を有するベクターである場合には、制限酵素でベクターを線状に切り開いた後にS. ポンベの細胞に導入することが好ましい。

この場合、環状DNA構造を有するベクターを切り開く位置は、組換え部位内とする。これにより、切り開かれたベクターの両端にそれぞれ組換え部位が部分的に存在することとなり、相同組換えによりベクター全体が染色体の標的部位に組み込まれる。

10

ベクターは、両端それぞれに組換え部位の一部が存在するような線状DNA構造とすることができれば、環状DNA構造を有するベクターを切り開く方法以外の方法で構築してもよい。

【0050】

ベクターとしては、たとえば、pBR322、pBR325、pUC118、pUC119、pUC18、pUC19等の大腸菌由来のプラスミドを好適に用いることができる。

この場合、相同組換えに用いる際のプラスミドベクターは、大腸菌内での複製のために必要な「ori」と呼ばれる複製開始領域が除去されていることが好ましい。これにより、上述したベクターを染色体に組み込む際に、その組み込み効率を向上させることができる。

20

複製開始領域が除去されたベクターの構築方法は特に限定されないが、特開2000-262284号公報に記載されている方法を用いることが好ましい。すなわち、組換え部位内の切断箇所に複製開始領域が挿入された前駆体ベクターを構築しておき、前述のように線状DNA構造とすると同時に複製開始領域が切り出されるようにする方法が好ましい。これにより、簡便に複製開始領域が除去されたベクターを得ることができる。

また、特開平5-15380号公報、特開平7-163373号公報、国際公開第96/23890号パンフレット、特開平10-234375号公報等に記載された発現ベクターおよびその構築方法を適用して、発現カセットおよび組換え部位を有する前駆体ベクターを構築し、さらに通常の遺伝子工学的手法で該前駆体ベクターから複製開始領域を除去して相同組換えに用いるベクターを得る方法であってもよい。

30

【0051】

<標的部位>

ベクターを組み込む標的部位は、S. ポンベの染色体中の1箇所のみが存在していてもよく、2箇所以上に存在していてもよい。標的部位が2箇所以上存在している場合、S. ポンベの染色体の2箇所以上に該ベクターを組み込める。また、1の発現カセット中のLDH遺伝子を複数とした場合には、標的部位の1箇所に複数のLDH遺伝子を組み込むことができる。さらに、2種以上の標的部位に、それぞれの標的部位に対応する組換え部位を有する2種以上のベクターを用いて、発現カセットを組み込むこともできる。該方法で、S. ポンベの染色体に複数のLDH遺伝子を組み込むことができ、これによりLDHの発現量を増大させ、乳酸の生産性を向上させることができる。

40

【0052】

1箇所の標的部位に発現カセットを組み込む場合、たとえば特開2000-262284号公報に記載の方法記載の標的部位を使用できる。異なる組込み部位を有する2種以上のベクターを用いて、異なる標的部位にそれぞれベクターを組み込むことができる。しかし、染色体の2箇所以上にベクターを組み込む場合、該方法は煩雑である。

【0053】

染色体中に複数箇所存在する互いに実質的に同一の塩基配列部分を標的部位として、該複数箇所の標的部位にそれぞれベクターを組み込むことができれば、1種類のベクターを使用して染色体の2箇所以上にベクターを組み込むことができる。互いに実質的に同一の

50

塩基配列とは、塩基配列の相同性が90%以上であることを意味する。標的部同士との相同性は95%以上であることが好ましい。また、互いに実質的に同一である塩基配列の長さは、前記ベクターの組換え部位を包含する長さであり、1000bp以上であることが好ましい。1箇所の標的部に複数のLDH遺伝子が組み込まれている場合に比較して、LDH遺伝子の組み込み数が同一であっても、複数存在する標的部にLDH遺伝子が分散して組み込まれている場合には、形質転換体が増殖する際にLDH遺伝子が染色体から1度に脱落することが少なくなり、形質転換体の継代における維持安定性が向上する。

#### 【0054】

染色体中の3箇所の標的部にそれぞれ1個のHsLDH遺伝子を有する発現カセットを組み込む場合、該発現カセットを組み込む標的部としては、たとえば、ura4遺伝子座近傍、leu1遺伝子座近傍、adh1遺伝子座近傍、gpd1遺伝子座近傍、eno101遺伝子座近傍、leu1遺伝子座近傍、およびgpm1遺伝子座近傍から選ばれる3箇所が挙げられる。

10

#### 【0055】

なお、「X遺伝子座近傍」とは、染色体中のX遺伝子のORFの上流端から上流10kbp(10000bp)から、該ORFの下流端から下流10kbpまでの範囲内であって、他の遺伝子のORFを含まない領域を意味する。

#### 【0056】

本発明に係る形質転換体としては、HsLDH遺伝子が、S.ポンベの染色体中のeno101遺伝子座近傍、leu1遺伝子座近傍、およびgpm1遺伝子座近傍から選ばれる標的部に導入されているものが好ましい。すなわち、本発明に係る形質転換体としては、HsLDH遺伝子が、S.ポンベの染色体中のeno101遺伝子座上流10000bpから下流10000bpの領域、leu1遺伝子座上流10000bpから下流10000bpの領域、およびgpm1遺伝子座上流10000bpから下流10000bpの領域から選ばれる領域に導入されているものが好ましく、S.ポンベの染色体中のeno101遺伝子座上流5000bpから下流5000bpの領域、leu1遺伝子座上流5000bpから下流5000bpの領域、およびgpm1遺伝子座上流5000bpから下流5000bpの領域から選ばれる領域に導入されているものがより好ましい。

20

#### 【0057】

染色体中に複数箇所存在する標的部としては、トランスポゾン遺伝子Tf2が挙げられる。Tf2は、S.ポンベの3本(一倍体)の染色体それぞれに合計13箇所存在するトランスポゾン遺伝子であり、長さ(塩基数)は約4900bpであり、それらの遺伝子間における塩基配列相同性は99.7%であることが知られている(下記文献参照)。

30

Nathan J. Bowen et al, "Retrotransposons and Their Recognition of pol II Promoters: A Comprehensive Survey of the Transposable Elements From the Complete Genome Sequence of Schizosaccharomyces pombe", Genome Res. 2003 13: 1984-1997

#### 【0058】

染色体に13箇所存在するTf2の1箇所のみにベクターを組み込むことができる。この場合、2個以上のLDH遺伝子を有するベクターを組み込むことにより、2個以上のLDH遺伝子を有する形質転換体を得ることができる。また、Tf2の2箇所以上にベクターを組み込むことにより、2個以上のLDH遺伝子を有する形質転換体を得ることができる。この場合、2個以上のLDH遺伝子を有するベクターを組み込むことにより、さらに多くのLDH遺伝子を有する形質転換体を得ることができる。

40

#### 【0059】

<形質転換方法>

形質転換方法は、公知の形質転換方法がいずれも用いられる。該形質転換方法としては、たとえば、酢酸リチウム法、エレクトロポレーション法、スフェロプラスチ法、ガラスビーズ法など従来周知の方法、特開2005-198612号公報記載の方法が挙げられる。また、市販の酵母形質転換用キットを用いてもよい。

#### 【0060】

50

S . ポンペ宿主を相同組み換え法で形質転換する方法としては、公知の相同組み換え法を使用できる。本発明に係る形質転換体を製造する際の形質転換方法としては、上述のPDC遺伝子群の一部の遺伝子が欠失または失活したS . ポンペを宿主とし、その染色体に上述のベクターを用いて、発現カセットを相同組換えにより組み込む方法が好ましい。該方法によれば、本発明に係る形質転換体を簡便に製造できる。

#### 【0061】

形質転換体の製造では、通常、相同組換えを行った後、得られた形質転換体を選択する。選択する方法としては、たとえば、以下に示す方法が挙げられる。前記栄養要求性マーカーにより形質転換体を選択できる培地によりスクリーニングし、得られたコロニーから複数を選擇する。次に、それらを別々に液体培養した後、それぞれの培養液における異種蛋白質（本発明においては、HsLDH）の発現量を調べ、該異種蛋白質の発現量がより多い形質転換体を選択する。それら選擇した形質転換体に対してパルスフィールドゲル電気泳動法によるゲノム解析を行うことにより、染色体に組み込まれたベクターの数および発現カセットの数を調べられる。

染色体に組み込まれるベクターの数は組み込み条件などを調整することによりある程度は調整可能である。ベクターの大きさ（塩基数）および構造により、組み込み効率および組み込み数も変化すると考えられる。

#### 【0062】

一般には発現カセットの数が多いほどLDHの発現効率が高まり、ひいては乳酸の生産効率が高まると予想される。このため、S . ポンペの染色体に複数のLDH遺伝子を組み込むことによりLDHの発現量を増大させ、乳酸の生産性を向上させることができると考えられる。しかし、発現カセットの数が多すぎると細胞の生存および増殖に対する負荷が増大し、ひいては乳酸生産効率が低下することも考えられる。一方で、1の発現カセットに複数の遺伝子を含ませることにより、染色体に組み込む発現カセットの数を抑えつつ、多数のLDH遺伝子を染色体に組み込むことができる。しかし、ベクターが大きくなると、染色体に組み込まれる確率が低下し、組み込まれるベクター数を多くすることが困難となり、ひいては形質転換体を得ること自体が困難となると考えられる。

#### 【0063】

そこで、本発明者等は、適度な大きさの発現カセットを染色体に比較的少数組み込んだ場合でも、より高い乳酸生産効率を有するS . ポンペ形質転換体を得るためには、S . ポンペにおける発現効率が高く、かつ発現したLDHの活性も高い外来LDH遺伝子を選択して適切なコピー数導入することが必要であると考えた。そして、HsLDH遺伝子3～5コピーをPDC遺伝子群の一部の遺伝子が欠失または失活しているS . ポンペ形質転換体に組み込むことにより、HsLDH遺伝子1コピーまたは2コピーを組み込んだS . ポンペ形質転換体よりも、乳酸産生効率が非常に高く、増殖能はさほど損なわれていない形質転換体を得られることがわかった。

#### 【0064】

##### [乳酸の製造方法]

本発明に係る乳酸の製造方法は、前記本発明に係る形質転換体を培養液中で培養し、該培養液から乳酸を取得する乳酸の製造方法である。

本発明に係る形質転換体を、糖を含む培養液中で培養することにより、解糖系により該糖から得られるピルビン酸がLDHにより還元されて乳酸が産生され、培養液に産出された乳酸を培養液から取得することで乳酸を製造できる。

#### 【0065】

乳酸の製造に用いる培養液としては、糖を含有する公知の酵母培養培地を用いることができ、さらにS . ポンペが資化する窒素源、無機塩類等を含有し、S . ポンペの培養を効率良く行えるものであればよい。培養液としては、天然培地を用いてもよく、合成培地を用いてもよい。

炭素源である糖としては、たとえば、グルコース、フルクトース、スクロース、マルトース等の糖が挙げられる。窒素源としては、たとえば、アンモニア、塩化アンモニウム、

10

20

30

40

50

酢酸アンモニウム等の無機酸または無機酸のアンモニウム塩、ペプトン、カザミノ酸、イーストエキス等が挙げられる。無機塩類としては、たとえば、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム等が挙げられる。さらには、プロテオリピド等の発酵促進因子などを含ませることができる。

**【0066】**

本発明に係る乳酸の製造方法では、糖として特にグルコースを含有する培養液を用いることが好ましい。培養初期の培養液(100質量%)中のグルコース濃度は1質量%以上が好ましく、1~50質量%がより好ましく、2~16質量%がさらに好ましい。培養によりグルコース濃度が低下することより、必要によりグルコースを添加して培養を継続することが好ましい。培養終期のグルコース濃度は1質量%以下となってもよい。また、乳酸を分離しながら培養液を循環させて連続的に培養を行う場合には、前記グルコース濃度を維持することが好ましい。グルコース濃度を2質量%以上とすることにより、乳酸の生産性がより向上する。また、培養液中のグルコースを16質量%以下とすることにより、乳酸の生産効率がより向上する。

10

**【0067】**

また、乳酸製造の生産性を高くするために、高密度培養を行うことが好ましい。高密度培養では、培養液中の形質転換体の初発菌体濃度を乾燥菌体重量換算値で表して0.1~5g/Lとすることが好ましい。培養液中の形質転換体の初発菌体濃度を乾燥菌体重量換算値で表して0.2~2g/Lとすることがより好ましい。初発菌体濃度を高くすることにより短時間で高い生産性を達成できる。また、初発菌体濃度があまりに高すぎると菌体の凝集および精製効率の低下等の問題が生じるおそれがある。

20

なお、後述の実施例等で示す菌体濃度は、日本分光社製可視紫外分光器V550によって測定した波長660nmの光の吸光度( $OD_{660}$ )から換算した値である。660nmにおける $OD_{660} = 1$ は、分裂酵母乾燥重量の0.2g、湿重量の0.8gに相当する。

**【0068】**

培養には公知の酵母培養方法を用いることができ、たとえば振とう培養、攪拌培養等により行うことができる。

また、培養温度は、23~37であることが好ましい。また、培養時間は適宜決定できる。

30

また、培養は、回分培養であってもよく、連続培養であってもよい。たとえば、回分培養で培養を行った後、菌体を培養液から分離して、乳酸を含む培養液を取得できる。また、連続培養法では、たとえば、培養中の培養槽から培養液の一部を抜き出し、抜き出した培養液から乳酸を分離するとともに、培養上清を回収し、該培養上清にグルコースおよび新たな培養液等を加えて培養槽に戻すことを繰り返して、連続的に培養する方法が挙げられる。連続培養を行うことにより、乳酸の生産性がより向上する。

**【0069】**

本発明に係る形質転換体を用いた乳酸の製造方法では、耐酸性に特に優れたS.ポンベを用いているため、乳酸の蓄積により低pH(pH2~4程度)となっても中和を行わずに乳酸を生産できる。そのため、培養液のpHが3.5以下になった後も、さらに培養を継続する連続培養により乳酸を製造できる。培養終期のpHおよび連続培養におけるpHは、3.5以下が好ましく、特に2.3~3.5が好ましい。乳酸の生産性を高くするために、培養液のpHが3.5以下になった後にさらに培養を継続することが好ましい。本発明に係る形質転換体は耐酸性が優れているため、該形質転換体により産生された培養液中の乳酸を中和することなく培養を継続できる。

40

**【0070】**

培養液からの乳酸の取得は、公知の方法を用いることができる。特に、培養液中の乳酸を中和することなく、培養液と乳酸を分離して、乳酸を取得することが好ましい。たとえば、培養終了後の培養液から遠心分離により菌体を分離し、pH1以下にした後にジエチルエーテルや酢酸エチル等により抽出する方法、イオン交換樹脂に吸着させて洗浄した後

50

に溶出させる方法、活性炭を用いて不純物を除去する方法、酸触媒の存在下でアルコールと反応させた後に蒸留する方法、分離膜を用いて分離する方法が挙げられる。また、場合によっては培養液中の乳酸を中和した後培養液と乳酸塩を分離して、乳酸を取得することもできる。たとえば、培養液中の乳酸をカルシウム塩またはリチウム塩に変換し、該中和塩を晶析する方法で乳酸を取得することもできる。

#### 【0071】

以上説明した本発明に係る乳酸の製造方法は、特に耐酸性に優れた*S. ポンベ*を宿主とする形質転換体を用いるため、アルカリによる中和を行わなくても高い生産性で簡単に乳酸を製造できる。また、*PDC* 遺伝子群の一部の遺伝子が欠失または失活していることでエタノール発酵の効率が低下しているため、乳酸の対糖収率（消費された糖の量に対する乳酸の生産量の割合）が向上する。本発明においては、乳酸の対糖収率を50%以上とすることが容易にできる。場合により、乳酸の対糖収率は70%以上にも達する。また、本発明に係る乳酸の製造方法は、高濃度のグルコース存在下、および高濃度の形質転換体による高密度培養にも適している。

10

#### 【実施例】

#### 【0072】

以下、実施例および比較例を示して本発明を詳細に説明する。ただし、本発明は以下の記載によっては限定されない。また、本実施例においては特に断りのない限り「%」は「質量%」を意味する。

#### 【0073】

#### [例1]

*S. ポンベ*を宿主とし、*PDC2* 遺伝子が削除され、かつ*HsLDH* 遺伝子が3コピー導入された形質転換体を作製した。

20

#### 【0074】

<*S. ポンベ* *PDC2* 遺伝子削除株の作製>

*S. ポンベ*のウラシル要求性株 *ARC010* 株（遺伝子型：*h<sup>-</sup>*、*leu1-32*、*ura4-D18*）（国際公開第2007/015470号パンフレット参照。）を、*pd c 2* 削除断片で、東田らの方法（米国特許第6,235,499号明細書参照。）に従って形質転換し、該断片が *S. ポンベ*のゲノム上の *pd c 2* 遺伝子座近傍に導入された形質転換体を得た。該形質転換体を、さらに *Latour* 法（*Nucleic Acids Res.* 誌、2006年、34巻、e11頁、国際公開第2007/063919号パンフレットに記載）に従って *FOA* 処理し、*PDC2* 遺伝子（系統名：*SPAC1F8.07c*）を削除した削除株（*IGF543* 株）を作製した。

30

*pd c 2* 削除断片（2811bp、配列番号11）の作製には、*S. ポンベ*の *ARC032* 株（遺伝子型：*h<sup>-</sup>*）（国際公開第2007/015470号パンフレット参照。）から *DNeasy*（キアゲン社製）によって調製した全ゲノムDNAを鋳型とし、表1に示す塩基配列を有する8種の合成オリゴDNA（オペロン社製）を使用した。

#### 【0075】

【表1】

pdc2削除断片の作製のためのオリゴDNA		
オリゴDNA	塩基配列	配列番号
UF	5'-CTCTCCAGCTCCATCCATAAG-3'	1
UR	5'-GACACAAGTTCTACCAAAAAGCCTTTCTGCCCATGTTTTCTGTC-3'	2
OF	5'-GCTTTTTGGTAGGAAGTTGTGTC-3'	3
OR	5'-AGTGGGATTTGTAGCTAAGCTGTATCCATTTTCAGCCGTTTGTG-3'	4
DF	5'-AAGTTTCGTCAATATCACAAAGCTGACAGAAAACATGGGCAGAAAG-3'	5
DR	5'-GTTCCCTTAGAAAAAGCAACTTTGG-3'	6
FF	5'-CATAAGCTTGCCACCACTTC-3'	7
FR	5'-GAAAAAGCAACTTTGGTATTCTGC-3'	8

10

## 【0076】

具体的には、UFとURでUP領域を、OFとORでOL領域を、DFとDRでDN領域をそれぞれKOD-Dash（東洋紡社製）を用いたPCR法によって作製したのち、さらにそれらを鋳型として、それぞれFFとFRを用いた同様のPCR法によって全長の削除断片を作製した。全長の削除断片作製時には、表2に示す塩基配列を有する2種の合成オリゴDNA（オペロン社製）を用い、ARC032株より同様に調製した全ゲノムDNAを鋳型とし、同様のPCR法によって調製したura4領域断片も鋳型として合わせて使用した。

20

## 【0077】

【表2】

ura4断片の作製のためのオリゴDNA		
オリゴDNA	塩基配列	配列番号
F	5'-AGCTTAGCTACAAATCCCACT-3'	9
R	5'-AGCTTGTGATATTGACGAAACTT-3'	10

## 【0078】

得られたS.ポンベPDC2遺伝子削除株（IGF543株、h<sup>-</sup> leu1-32 ura4-D18 pdc2-D23）は生育速度が遅いものであった。そこで、その生育速度を回復すべく、IGF543株をYESプレート（イーストエキス0.5%/グルコース3%/SPサプリメント）にストリークして25℃にて培養し、得られたコロニーをYPD培地（イーストエキス1%/ペプトン2%/グルコース2%）に植え継ぎ25℃にて培養し、十分に生育した培養液を用いてグリセロールストックを作製し、-80℃にて保存した。前記作業を適切な生育速度が得られるまで繰り返し、生育速度の回復した株を作製した（名称はIGF543を継承）。

30

## 【0079】

< S.ポンベHsLDH遺伝子1コピー導入株の作製 >

まず、HsLDH遺伝子発現カセットを保持する単座組込型組換えベクターpSM-HsLDHベクター（4562bp、図1）を作製した。pSM-HsLDHベクターは、DNA合成により、配列番号12に示す塩基配列からなるDNA断片として作製した。

次いで、IGF543株を、pSM-HsLDHベクターで形質転換した。該操作により、HsLDH発現カセットがゲノム上のgpm1遺伝子座近傍に導入された。該形質転換株（HsLDH遺伝子1コピー導入株）をASP3494株とした。

40

## 【0080】

< S.ポンベHsLDH遺伝子2コピー導入株の作製 >

ASP3494株を、HsLDH遺伝子発現カセットを保持し、ihc1プロモーターを有する単座組込型組換えベクターpSL17-HsLDH（特許文献3参照。）の制限

50

酵素 B s i W I 消化物で、B a h l e r らの方法 ( Y e a s t 誌、1998年、14巻、943 - 951頁) に従い形質転換した。該操作により、該発現カセットがゲノム上の L e u 1 遺伝子座近傍に導入され、g p m 1 遺伝子座近傍に h C M V プロモーターによって制御された H s L D H 遺伝子を1コピーと、L e u 1 遺伝子座近傍に i h c プロモーターによって制御された H s L D H 遺伝子を1コピーとの合計2コピーの H s L D H 遺伝子が導入された形質転換株を作製した。該形質転換株 ( H s L D H 遺伝子2コピー導入株) を A S P 4 1 2 1 株とした。

【0081】

<ウラシル要求性の復帰>

p S M - H s L D H ベクターにより S . ポンベのゲノムに導入された u r a 4 遺伝子は、2つの h C M V プロモーター配列に挟まれている為、ホモログスリコンビネーションによりゲノム上から脱落しやすい。

10

そこで、A S P 4 1 2 1 株を F O A 処理し、ウラシルの要求性を復帰させた。

【0082】

< S . ポンベ H s L D H 遺伝子3コピー導入株の作製 >

まず、H s L D H 遺伝子発現カセットを保持する単座組込型組換えベクター p S N - H s L D H ベクター ( 4 5 3 5 b p、図2) を作製した。p S N - H s L D H ベクターは、D N A 合成により、配列番号13に示す塩基配列からなる D N A 断片として作製した。

次いで、A S P 4 1 2 1 株を F O A 処理してウラシルの要求性を復帰させた形質転換株を、p S N - H s L D H ベクターで形質転換した。該操作により、H s L D H 発現カセットがゲノム上の e n o 1 0 1 遺伝子座近傍に導入され、g p m 1 遺伝子座近傍に h C M V プロモーターによって制御された H s L D H 遺伝子を1コピーと、L e u 1 遺伝子座近傍に i h c プロモーターによって制御された H s L D H 遺伝子を1コピーと、e n o 1 0 1 遺伝子座近傍に h C M V プロモーターによって制御された H s L D H 遺伝子を1コピーとの合計3コピーの H s L D H 遺伝子が導入された形質転換株を作製した。該形質転換株 ( H s L D H 遺伝子3コピー導入株) を A S P 4 9 5 6 株とした。

20

【0083】

<ウラシル要求性の復帰>

p S M - H s L D H ベクターによる場合と同様に、p S N - H s L D H ベクターにより S . ポンベのゲノムに導入された u r a 4 遺伝子は、2つの h C M V プロモーター配列に挟まれている為、ホモログスリコンビネーションによりゲノム上から脱落しやすい。

30

そこで、A S P 4 9 5 6 株を F O A 処理し、ウラシルの要求性を復帰させた。

【0084】

<ウラシル要求性の補完>

A S P 4 9 5 6 株を F O A 処理してウラシルの要求性を復帰させた形質転換株を、u r a 4 遺伝子を含む D N A 断片 ( 3 2 7 7 b p、配列番号14) で形質転換し、ウラシル要求性が補完された形質転換株を作製した。該形質転換株 ( H s L D H 遺伝子3コピー導入栄養要求補完株) を A S P 5 0 1 9 株とした。

【0085】

<培養試験>

40

A S P 5 0 1 9 株と、特許文献3に記載の A S P 3 5 0 9 株、A S P 2 9 1 4 株、A S P 3 6 1 9 株、A S P 3 6 2 1 株、A S P 3 6 3 1 株、A S P 3 6 2 2 株、および A S P 3 6 2 3 株の増殖能と乳酸産生能を比較した。A S P 3 5 0 9 株は I G F 5 4 3 株に H s L D H 遺伝子1コピーを導入した株であり、A S P 2 9 1 4 株は I G F 5 4 3 株に H s L D H 遺伝子2コピーを導入した株であり、A S P 3 6 1 9 株は I G F 5 4 3 株に H s L D H 遺伝子1コピーと L b L D H 遺伝子 ( ラクトバチルス・ブルガリクス ( L a c t o b a c i l l u s b u l g a r i c u s ) の L D H 遺伝子) 1コピーを導入した株であり、A S P 3 6 2 1 株は I G F 5 4 3 株に H s L D H 遺伝子1コピーと S a L D H 遺伝子 ( スタヒロコッカス・アウレウス ( S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s ) の L D H 遺伝子) 1コピーを導入した株であり、A S P 3 6 3 1 株は I G F 5 4 3 株に H s L D H

50

遺伝子1コピーとLpLDH遺伝子1コピーを導入した株であり、ASP3622株はIGF543株にHsLDH遺伝子1コピーとLplLDH遺伝子(ラクトバチルス・プランタラム(Lactobacillus plantarum)のLDH遺伝子)1コピーを導入した株であり、ASP3623株はIGF543株にHsLDH遺伝子1コピーとPaLDH遺伝子(ペディオコッカス・アシディラクティシ(Pediococcus acidilactici)のLDH遺伝子)1コピーを導入した株である。

## 【0086】

各形質転換株を、500mL容の坂口フラスコ(AGCテクノグラス社製)に入った100mLのYPD6液体培地(イーストエキス1%、ペプトン2%、グルコース6%)に初発菌体濃度を0.04g(乾燥菌体換算)/Lになるように植菌して、温度32℃、振盪速度110rpmかつ振り幅7cmの振盪条件下で20時間培養を行った。培養液のOD<sub>660</sub>を測定した後、培養を終了し、菌体を回収した。直径18mmかつ長さ150mmの試験管に入った4.5mLの11.1%グルコース水溶液に初発菌体濃度を36g(乾燥菌体換算)/Lになるように接種し、温度32℃、仰角43.5°、110rpm、および振り幅7cmの振盪条件下で3時間発酵を行い、終了後、発酵液中の乳酸の濃度(g/L)を測定した。各形質転換体の20時間培養後の培養液の菌体濃度(g(乾燥菌体換算)(dcw)/L)および3時間発酵後の乳酸濃度(g/L)を表3に示す。

## 【0087】

## 【表3】

株名	LDH 由来	培養 20 時間後の菌体濃度 [g-dcw/L]	発酵 3 時間後の乳酸濃度[g/L]
ASP 3509	Hs	4.5	76.1
ASP 2914	Hs/Hs	3.7	78.3
ASP 3619	Hs/Lb	4.6	72.2
ASP 3621	Hs/Sa	4.6	72.5
ASP 3631	Hs/Lp	2.1	91.5
ASP 3622	Hs/Lpl	4.0	64.8
ASP 3623	Hs/Pa	3.1	73.1
ASP 5019	Hs/Hs/Hs	4.5	91.0

## 【0088】

HsLDH遺伝子1コピーを導入したASP3509株とHsLDH遺伝子2コピーを導入したASP2914株を比較すると、発酵3時間後の乳酸濃度はASP2914株のほうが高く、培養20時間後のOD<sub>660</sub>はASP3509株のほうが高かった。また、発酵3時間後の乳酸濃度が非常に高いASP3631株は、培養20時間後の培養液の菌体濃度は明らかに低かった。表3の結果を、縦軸を発酵3時間後の乳酸濃度(g/L)、横軸を培養20時間後の培養液の菌体濃度(g(乾燥菌体換算)(dcw)/L)とした分散図(図3)に示す。図3に示すように、乳酸産生能が高い形質転換体ほど、増殖能が低くなる傾向がある。図3中、直線は、ASP3509株とASP3631株のプロットを結んだ直線である。該傾向からは、HsLDH遺伝子3コピーを導入した形質転換株は、HsLDH遺伝子2コピーを導入した形質転換株(ASP2914株)と比べて、乳酸産生能は高く、増殖能は低いこと、および、仮にHsLDH遺伝子3コピーを導入した形質転換株の乳酸産生能がASP3631株よりも高い場合には、該株の増殖能はASP3631株よりも低いであろうことが、予想される。にもかかわらず、HsLDH遺伝子3コピーを導入したASP5019株は、ASP3631株とほぼ同程度の高い乳酸産生能と、ASP3509株とほぼ同程度の十分な増殖能を有していた。

## 【0089】

## [例2]

例1で用いたASP5019株とASP3631株について、フラスコ培養し、増殖能と乳酸産生能を比較した。

具体的には、各形質転換株をYES液体培地(イーストエキス5g/L、グルコース3

0 g / L、アデニン 1 g / L、ヒスチジン 1 g / L、ロイシン 1 g / L、ウラシル 1 g / L、リシン 1 g / L) に植菌して、温度 32 °C、振盪速度 110 rpm の条件下で 30 時間培養を行った。培養終了後、菌体を回収し、表 4 に示す組成に微量元素類およびビタミン類を適量加えた培養培地を張り込んだ、3 L 容ジャーファーマンターに接種し、温度 32 °C、OD カスケード制御下にて 60 時間流加培養を行い、終了後、培養液の OD<sub>660</sub> を測定した。

次いで、培養終了後の培養液から遠心分離処理により菌体を分離し、該菌体を 11.1 % グルコース水溶液に初発菌体濃度が 36 g (乾燥菌体換算) / L (OD<sub>660</sub> = 180) になるように接種したものを発酵液として、7 時間試験管にて発酵させた。発酵終了後の発酵液の乳酸濃度 (g / L) を測定した。

【0090】

【表 4】

成分	濃度
Yeast Extract	20 g/L
含水グルコース(含水率:8-9%)	33 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	15 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8 g/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5.34 g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.04 g/L
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.2 g/L

【0091】

各形質転換体の 60 時間培養後の培養液の OD<sub>660</sub> と 7 時間発酵後の発酵液の乳酸濃度 (g / L) の測定結果を図 4 に示す。ASP5019 株は、ASP3631 株と同様に乳酸産生能が高く、かつ増殖能は ASP3631 株よりも顕著に優れていることが確認された。

【0092】

[例 3]

例 1 で用いた ASP5019 株と ASP3631 株について、連続培養し、乳酸産生能を比較した。

具体的には、例 2 と同様の方法を用いて得られた 60 時間流加培養菌体を回収し、該菌体を表 5 に示す組成に微量元素類およびビタミン類を適量加えた発酵培地に、初発菌体濃度が 36 g (乾燥菌体換算) / L (OD<sub>660</sub> = 180) になるように接種したものを発酵液とした。該発酵液 0.5 L を、1 L 容ジャーファーマンター中に移し、クロスフロー方式の精密濾過膜を通して循環させた。そして、一定流量で発酵培地の供給および膜濾過液の引抜きを行う連続発酵を、28 °C で 200 時間超行った。その際、希釈率は 0.066 (1 / h) とした。該連続発酵では、菌体のサイズよりも小さい細孔径の精密濾過膜を用いているため、菌体は槽内へ還流され、200 時間超の連続発酵中においてリサイクルされた。アルカリを用いた pH の中和は行わなかった。

【0093】

【表 5】

成分	濃度
Yeast Extract	5 g/L
含水グルコース(含水率:8-9%)	136.4 g/L
C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> KO <sub>4</sub> (フタル酸水素カリウム)	3 g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.2 g/L
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1.05 g/L
KCl	1 g/L
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.04 g/L

【 0 0 9 4 】

連続発酵における発酵液中の乳酸濃度 ( g / L ) の経時変化を図 5 に示す。連続発酵を 2 0 0 時間超行った結果、発酵開始から 1 2 0 時間経過時点までは、 A S P 5 0 1 9 株と A S P 3 6 3 1 株の乳酸濃度はほぼ同程度であり、ほぼ一定で推移し、発酵開始から 1 5 0 時間経過時点以降は、低下傾向にあった。ただし、乳酸濃度の低下傾向は、 A S P 3 6 3 1 株よりも A S P 5 0 1 9 株のほうが、緩やかであった。該結果から、 A S P 5 0 1 9 株は、長期運転かつ高酸素条件下における乳酸生産能が顕著に高いことがわかった。

【 産業上の利用可能性 】

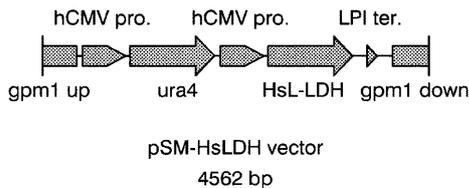
【 0 0 9 5 】

本発明に係る形質転換体およびそれを用いた乳酸の製造方法は、低 pH でもアルカリによる中和を行わずに高い生産性で乳酸を生産できるため、乳酸の工業的な製造方法として好適に用いることができる。

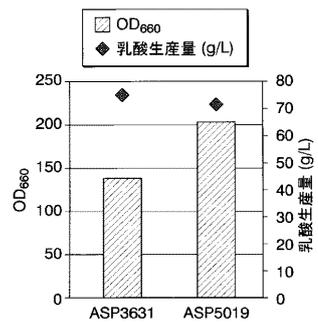
なお、2014年10月10日に出願された日本特許出願 2014 - 209048 号の明細書、特許請求の範囲、要約書および図面の全内容をここに引用し、本発明の明細書の開示として、取り入れるものである。

10

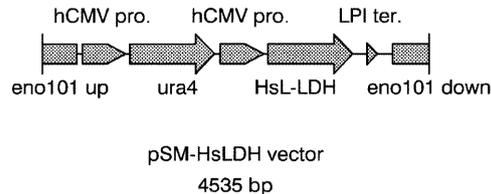
【 図 1 】



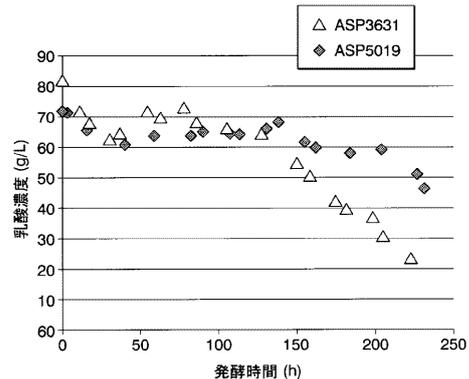
【 図 4 】



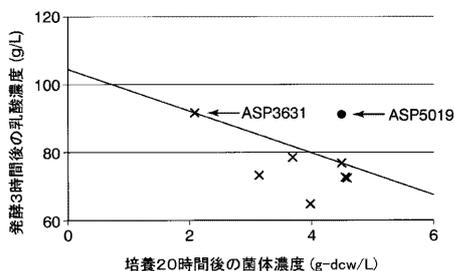
【 図 2 】



【 図 5 】



【 図 3 】



【配列表】

0006620375000001.app

---

フロントページの続き

- (72)発明者 鹿島 絢子  
東京都千代田区丸の内一丁目5番1号 旭硝子株式会社内
- (72)発明者 木村 修一郎  
東京都千代田区丸の内一丁目5番1号 旭硝子株式会社内

審査官 福澤 洋光

- (56)参考文献 国際公開第2011/021629(WO, A1)  
国際公開第2014/030655(WO, A1)  
原太志, et al., 分裂酵母Schizosaccharomyces pombeを用いた乳酸生産, 第61回日本生物工学会大会講演要旨集, 2009年, p.190, 2Mp08

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/00 - 15/90

C12P 1/00 - 41/00

CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus(JDreamIII)

PubMed