

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-195860

(P2017-195860A)

(43) 公開日 平成29年11月2日(2017.11.2)

(51) Int.Cl.

**C 12 N** 1/21 (2006.01)  
**C 12 N** 15/09 (2006.01)  
**C 12 P** 7/46 (2006.01)  
**C 12 P** 13/00 (2006.01)  
**C 07 K** 14/32 (2006.01)

F 1

C 12 N 1/21  
C 12 N 15/00  
C 12 P 7/46  
C 12 P 13/00  
C 07 K 14/32

Z N A

A

テーマコード(参考)

4 B 0 5 0

4 B 0 6 4

4 B 0 6 5

4 H 0 4 5

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願2016-91786(P2016-91786)

(22) 出願日

平成28年4月28日(2016.4.28)

(出願人による申告) 平成24年度独立行政法人科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業先端的低炭素化技術開発「汎用的高効率バイオプロセス細胞の創製」に係る委託業務、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(71) 出願人 000000918

花王株式会社

東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番10号

(71) 出願人 504176911

国立大学法人大阪大学

大阪府吹田市山田丘1番1号

(74) 代理人 110000084

特許業務法人アルガ特許事務所

(74) 代理人 100077562

弁理士 高野 登志雄

(74) 代理人 100096736

弁理士 中嶋 俊夫

(74) 代理人 100117156

弁理士 村田 正樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】枯草菌変異株及びそれを用いたジピコリン酸の製造方法

## (57) 【要約】

【課題】ジピコリン酸を高生産することができる枯草菌変異株の提供。

【解決手段】枯草菌変異株であって、

prophage 6 領域、prophage 1 領域、prophage 4 領域、PBS X 領域、prophage 5 領域、prophage 3 領域、spb 領域、pks 領域、skin 領域、pps 領域、prophage 2 領域、ydcL-ydeK-ydhU 領域、ysisB-yitD 領域、yunA-yurT 領域、cgeE-ypmQ 領域、ye eK-yesX 領域、pdprhocR 領域、ycxB-sipU 領域、SKIN-Pr o7 領域、sbo-ywhH 領域、yybP-yyaJ 領域及びyncM-fosB 領域からなる群より選択される1以上の領域が欠失したゲノムを有し、

ジピコリン酸シンターゼ遺伝子の発現が強化されており、且つホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ遺伝子が欠失又は不活性化されている、枯草菌変異株。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

枯草菌変異株であって、

prophage 6 領域、prophage 1 領域、prophage 4 領域、PBS X 領域、prophage 5 領域、prophage 3 領域、spb 領域、pks 領域、skin 領域、pps 領域、prophage 2 領域、ydcL-ydeK-ydhU 領域、ysisB-yitD 領域、yunA-yurT 領域、cgeE-ypmQ 領域、yeek-yesX 領域、pdprrocR 領域、ycxB-sipU 領域、SKIN-Pr07 領域、sbo-ywhH 領域、yybP-yyaJ 領域及びyncM-fosB 領域からなる群より選択される 1 以上の領域が欠失したゲノムを有し、

ジピコリン酸シンターゼ遺伝子の発現が強化されており、且つホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ遺伝子が欠失又は不活性化されている、枯草菌変異株。

## 【請求項 2】

prophage 6 領域、prophage 1 領域、prophage 4 領域、PBS X 領域、prophage 5 領域、prophage 3 領域、spb 領域、pks 領域、skin 領域、pps 領域、prophage 2 領域、ydcL-ydeK-ydhU 領域、ysisB-yitD 領域、yunA-yurT 領域、cgeE-ypmQ 領域、yeek-yesX 領域、pdprrocR 領域、ycxB-sipU 領域、SKIN-Pr07 領域、sbo-ywhH 領域、yybP-yyaJ 領域及びyncM-fosB 領域を欠失したゲノムを有する、請求項 1 記載の枯草菌変異株。

## 【請求項 3】

前記ジピコリン酸シンターゼ遺伝子が、下記(i)及び(ii)に記載の遺伝子からなる群より選択される少なくとも 1 つである、請求項 1 又は 2 項記載の枯草菌変異株：

(i) 下記(a)～(f)からなる群より選択される少なくとも 1 つの枯草菌ジピコリン酸シンターゼ・サブユニット A 遺伝子又はこれに相当する遺伝子：

(a) 配列番号 1 に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

(b) 配列番号 1 に示すヌクレオチド配列と 80% 以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、且つ(ii)に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c) 配列番号 1 に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドの相補鎖に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つ(ii)に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(d) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(e) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列において 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、且つ(ii)に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(f) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列と 80% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ(ii)に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(ii) 下記(j)～(o)からなる群より選択される少なくとも 1 つの枯草菌ジピコリン酸シンターゼ・サブユニット B 遺伝子又はこれに相当する遺伝子：

(j) 配列番号 3 に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

(k) 配列番号 3 に示すヌクレオチド配列と 80% 以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、且つ(i)に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(l) 配列番号 3 に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドの相補鎖に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つ(i)に記載の遺伝子がコードす

10

20

30

40

50

るタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(m) 配列番号4に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(n) 配列番号4に示すアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、且つ(i)に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(o) 配列番号4に示すアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ(i)に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。 10

#### 【請求項4】

前記ジピコリン酸シンターゼ遺伝子が、枯草菌sp o VFA遺伝子及び枯草菌sp o VF遺伝子からなる群より選択される少なくとも1つである、請求項1～3のいずれか1項記載の枯草菌変異株。

#### 【請求項5】

枯草菌変異株の製造方法であって、

prophage6領域、prophage1領域、prophage4領域、PBSX領域、prophage5領域、prophage3領域、spb領域、pks領域、skin領域、pps領域、prophage2領域、ydcL-ydeK-ydhU領域、ysisB-yitD領域、yunA-yurT領域、cgeE-ypmQ領域、yeek-yesX領域、pdprrocR領域、ycxB-sipU領域、SKIN-Pro7領域、sbo-ywhH領域、yybP-yyaJ領域及びyncM-fosB領域からなる群より選択される1以上の領域が欠失したゲノムを有する枯草菌変異株において、

ジピコリン酸シンターゼ遺伝子の発現を強化し、且つホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ遺伝子を欠失又は不活性化することを含む、方法。 20

#### 【請求項6】

前記ジピコリン酸シンターゼ遺伝子が、下記(i)及び(ii)に記載の遺伝子からなる群より選択される少なくとも1つである、請求項5記載の方法： 30

(i) 下記(a)～(f)からなる群より選択される少なくとも1つの枯草菌ジピコリン酸シンターゼ・サブユニットA遺伝子又はこれに相当する遺伝子：

(a) 配列番号1に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

(b) 配列番号1に示すヌクレオチド配列と80%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、且つ(ii)に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c) 配列番号1に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドの相補鎖に対してストリンジェントな条件下ハイブリダイズし、且つ(ii)に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(d) 配列番号2に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(e) 配列番号2に示すアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、且つ(ii)に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(f) 配列番号2に示すアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ(ii)に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(ii) 下記(j)～(o)からなる群より選択される少なくとも1つの枯草菌ジピコリ 50

ン酸シンターゼ・サブユニットB遺伝子又はこれに相当する遺伝子：

(j) 配列番号3に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

(k) 配列番号3に示すヌクレオチド配列と80%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、且つ(i)に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(l) 配列番号3に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドの相補鎖に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つ(i)に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(m) 配列番号4に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(n) 配列番号4に示すアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、且つ(i)に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(o) 配列番号4に示すアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ(i)に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

#### 【請求項7】

前記ジピコリン酸シンターゼ遺伝子が、枯草菌sp oVFA遺伝子及び枯草菌sp oVF B遺伝子からなる群より選択される少なくとも1つである、請求項5～6のいずれか1項記載の方法。

#### 【請求項8】

請求項1～4のいずれか1項記載の枯草菌変異株を用いるジピコリン酸又はその塩の製造方法。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【技術分野】

#### 【0001】

本発明は、ジピコリン酸生産能を有する枯草菌変異株、及び当該枯草菌変異株を用いたジピコリン酸又はその塩の製造方法に関する。

#### 【背景技術】

#### 【0002】

ジピコリン酸(2,6-ピリジンジカルボン酸、DPA)は、天然物であり生分解性の高いキレート剤として知られており、産業用の用途として洗剤組成物や金属隠蔽剤、酸化防止剤などとして利用できることが報告されている。

#### 【0003】

ジピコリン酸は、2,6-ルチジンから酸化反応によって合成されることが知られている。すなわち、ニッケル化合物の存在下で次亜ハロゲン酸塩を酸化剤として用いる方法や、電解酸化法、空気酸化法などにより合成できることが知られている。しかし、これらの方法では、反応の転化率や選択率が不十分であり、原料である2,6-ルチジンや反応中間体である6-メチル-2-ピリジンカルボン酸等のアルキルピリジンが反応液中に残存し、2,6-ピリジンジカルボン酸(ジピコリン酸)中に不純物として混入するため、高純度のジピコリン酸を製造することは困難であった。

#### 【0004】

一方、微生物を使用するジピコリン酸の製造方法によれば、アルキルピリジンを含有することなくジピコリン酸を高純度に製造できると期待される。微生物を用いたジピコリン酸の製造方法としては、胞子を形成する微生物であるバシラス(Bacillus)属を用いた発酵法による製造方法(特許文献1及び2)及びカビを用いた製造方法(特許文献3)が知られている。

#### 【0005】

10

20

30

40

50

また、遺伝子工学的に改変した微生物を用いたジピコリン酸の製造方法が知られている。特許文献4には、遺伝子組換えリジン生産菌を利用したジピコリン酸の製造方法が開示されている。特許文献5には、ジピコリン酸合成経路に関する遺伝子の発現パターンを改変したバシラス(*Bacillus*)属又はクロストリジウム(*Clostridium*)属微生物を利用したジピコリン酸の製造方法が開示されている。また、特許文献6には、ゲノムの大領域を欠失させて得られた枯草菌変異株に対してジピコリン酸シンターゼ遺伝子の発現を強化し、且つアセトイン合成に関わる遺伝子の発現を欠失させた枯草菌変異株がジピコリン酸の生産性に優れていることが記載されている。

#### 【0006】

ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼは、ATPの加水分解エネルギーを利用して、オキサロ酢酸(OAA)を脱炭酸してホスホエノールピルビン酸(PEP)の合成を触媒する酵素で、糖新生に必須な酵素である。10

これまでに、枯草菌のホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ遺伝子(pckA遺伝子)を破壊した場合に、N-アセチル-D-グルコサミンの生産性が向上すること(特許文献7)、またPckA活性を増強させた変異微生物においてコハク酸の生産量が向上すること(特許文献8)が報告されている。

しかしながら、枯草菌においてpckA遺伝子の発現がDPAの生産に如何なる影響を及ぼすかは不明である。20

#### 【先行技術文献】

##### 【特許文献】

##### 【0007】

【特許文献1】特開2004-275075号公報

【特許文献2】獨国特許第2300056号公報

【特許文献3】米国特許第3334021号公報

【特許文献4】特開2002-371063号公報

【特許文献5】特開2008-048732号公報

【特許文献6】特開2015-213471号公報

【特許文献7】中国特許出願公開第105238724号明細書

【特許文献8】特開2014-150748号公報

#### 【発明の開示】

##### 【発明が解決しようとする課題】

##### 【0008】

本発明は、ジピコリン酸(2,6-ピリジンジカルボン酸、以下の本明細書において、DPAとも称する)を高生産することができる枯草菌変異株、当該枯草菌変異株の製造方法、及び当該枯草菌変異株を用いたDPA又はその塩の製造方法に関する。30

#### 【課題を解決するための手段】

##### 【0009】

本発明者らは、DPAを効率良く生産することができる微生物株の開発を進めた。その結果、ゲノムの大領域が欠失した枯草菌変異株において、ジピコリン酸シンターゼ遺伝子の発現を強化することと、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ遺伝子を欠失又は不活性化することにより、得られた枯草菌変異株が顕著に高いDPA生産能を有することを見出し、本発明を完成した。40

##### 【0010】

すなわち本発明は、一態様において、以下を提供する：

枯草菌変異株であって、

*prophage 6*領域、*prophage 1*領域、*prophage 4*領域、*PBS X*領域、*prophage 5*領域、*prophage 3*領域、*s pb*領域、*pks*領域、*skin*領域、*pps*領域、*prophage 2*領域、*ydcL-ydeK-ydhU*領域、*yisB-yitD*領域、*yuna-yurt*領域、*cgeE-ypmQ*領域、*yeek-yesX*領域、*pdp-rocr*領域、*ycxB-sipU*領域、*SKIN-Pr*

50

o 7 領域、 s b o - y w h H 領域、 y y b P - y y a J 領域及び y n c M - f o s B 領域からなる群より選択される 1 以上の領域が欠失したゲノムを有し、

ジピコリン酸シンターゼ遺伝子の発現が強化されており、且つホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ遺伝子が欠失又は不活性化されている、枯草菌変異株。

#### 【0011】

別の態様において、本発明は以下を提供する：

枯草菌変異株の製造方法であって、

prophage 6 領域、 prophage 1 領域、 prophage 4 領域、 PBS X 領域、 prophage 5 領域、 prophage 3 領域、 spb 領域、 pks 領域、 skin 領域、 pps 領域、 prophage 2 領域、 ydcL - ydeK - ydhU 領域、 yisB - yitD 領域、 yunA - yurT 領域、 cgeE - ypmQ 領域、 yek - yesX 領域、 pdp - rocR 領域、 ycxB - sipU 領域、 SKIN - Pro 7 領域、 sbo - ywhH 領域、 yybP - yyaj 領域及び yncM - fosB 領域からなる群より選択される 1 以上の領域が欠失したゲノムを有する枯草菌変異株において

ジピコリン酸シンターゼ遺伝子の発現を強化し、且つホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ遺伝子を欠失又は不活性化する、ことを含む、方法。

#### 【0012】

また別の態様において、本発明は、上記枯草菌変異株を用いるジピコリン酸又はその塩の製造方法を提供する。

#### 【発明の効果】

#### 【0013】

本発明の枯草菌変異株は高い DPA 生産能を有する。本発明の枯草菌変異株を用いることにより DPA 又はその塩を効率よく製造することが可能になる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0014】

【図 1】枯草菌のゲノム上から所定の領域を欠失させる方法の一例を示す模式図。

【図 2】枯草菌ゲノムから外来薬剤耐性遺伝子を除去する手順を示す模式図。

【図 3】枯草菌変異株へのジピコリン酸シンターゼ遺伝子の導入手順及び導入位置に関する一実施形態を示す模式図。

【図 4】mazF カセットを使用したマーカーフリー欠失法にて枯草菌変異株から特定の遺伝子を欠失させる手順を示す模式図。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0015】

本明細書に記載の枯草菌の各遺伝子及びゲノム領域の名称は、 JAFAN : Japan Functional Analysis Network for Bacillus subtilis (BSORF DB) でインターネット公開 ([bacillus.genome.ad.jp/]、 2006 年 1 月 18 日更新) された枯草菌ゲノムデータに基づいて記載されている。

#### 【0016】

本明細書において、アミノ酸配列及びヌクレオチド配列の同一性は Lipman - Pearson 法 (Lipman, D.J., Pearson, W.R.: Science, 1985, 227: 1435 - 1441) によって計算される。具体的には、遺伝情報処理ソフトウェア Genetyx-Win Ver.1.1 (ソフトウェア開発) のホモロジー解析 (Search homology) プログラムを用いて、 Unit size to compare (k t u p) を 2 として解析を行うことにより算出される。

#### 【0017】

本明細書において、別途定義されない限り、アミノ酸配列又はヌクレオチド配列におけるアミノ酸又はヌクレオチドの欠失、置換、付加又は挿入に関して使用される「 1 又は数個」の「数個」とは、例えば、対象となるアミノ酸配列又はヌクレオチド配列の総アミノ酸残基数又は総ヌクレオチド数の 20 % 以下の最大整数、好ましくは同じく 10 % 以下の

10

20

30

40

50

最大整数、より好ましくは同じく 5 %以下の最大整数、さらに好ましくは同じく 4 %以下の最大整数、さらに好ましくは同じく 3 %以下の最大整数、さらに好ましくは同じく 2 %以下の最大整数、さらにより好ましくは同じく 1 %以下の最大整数を意味する。また本明細書において、アミノ酸又はヌクレオチドの「付加」には、配列の一末端及び両末端への 1 又は数個のアミノ酸又はヌクレオチドの付加が含まれる。

#### 【0018】

本明細書において、ハイブリダイゼーションに関する「ストリンジエントな条件」とは、配列同一性が約 80 %以上若しくは約 90 %以上のヌクレオチド配列を有する遺伝子の確認を可能にする条件である。「ストリンジエントな条件」としては、Molecular Cloning - A LABORATORY MANUAL THIRD EDITIION (Joseph Sambrook, David W. Russell, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001) 記載の条件が挙げられる。ハイブリダイゼーションの当業者は、プローブのヌクレオチド配列や濃度、長さ等に応じて、ハイブリダイゼーション溶液の塩濃度、温度等を調節することにより、ストリンジエントな条件を適切に作り出すことができる。一例を示せば、上記「ストリンジエントな条件」とは、ハイブリダイゼーション条件としては、5 × SSC、70 10 以上が好ましく、5 × SSC、85 以上がより好ましく、洗浄条件としては、1 × SSC、60 以上が好ましく、1 × SSC、73 以上がより好ましい。上記 SSC 及び 温度条件の組み合わせは例示であり、当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーを決定する上記若しくは他の要素を適宜組み合わせることにより、適切なストリンジエンシーを実現することが可能である。 20

#### 【0019】

本明細書において、遺伝子又は領域の上流及び下流とは、それぞれ、対象として捉えている遺伝子又は領域の 5' 側及び 3' 側に続く領域を示す。

#### 【0020】

本明細書において、遺伝子の制御領域とは、下流の遺伝子の細胞内における発現を制御する機能を有し、好ましくは、下流遺伝子を構成的に発現又は高発現させる機能を有する領域である。本明細書において、遺伝子の制御領域とは、当該遺伝子におけるコーディング領域の上流に存在し、RNA ポリメラーゼが相互作用して当該遺伝子の転写を制御する機能を有する領域と定義され得る。好ましくは、本明細書における遺伝子の制御領域とは、当該遺伝子におけるコーディング領域の上流 200 ~ 600 ヌクレオチド程度の領域をいう。制御領域は、遺伝子の転写開始制御領域及び / 又は翻訳開始制御領域を含む。転写開始制御領域は制御領域及び転写開始点を含む領域であり、翻訳開始制御領域は開始コドンと共にリボソーム結合部位を形成する Shine - Dalgarno (SD) 配列に相当する部位である (Shine, J., Dalgarno, L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1974, 71: 1342 - 1346)。 30

#### 【0021】

本明細書において、特定の遺伝子を「制御領域の制御下に配置する」とは、制御領域による遺伝子の発現を制御する機能が特定遺伝子に作用するように、DNA 上で制御領域と特定遺伝子とを配置することをいう。特定遺伝子を制御領域の制御下に配置する方法としては、当該制御領域の制御の及ぶ下流に当該特定遺伝子を連結する方法が挙げられる。 40

#### 【0022】

##### (1. 枯草菌変異株の製造)

##### (1-1. ゲノム欠失枯草菌変異株)

本発明の枯草菌変異株は、枯草菌野生株のゲノム上の大領域が欠失したゲノムを有し、ジピコリン酸シンターゼ遺伝子の発現が強化されており、且つホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ遺伝子が欠失又は不活性化されている、枯草菌変異株である。好ましくは、本発明の枯草菌変異株は、該ゲノムの大領域が欠失した枯草菌変異株に対して、ジピコリン酸シンターゼ遺伝子の発現を強化する改変と、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ遺伝子を欠失又は不活性化させる改変とを加えることによって作製される。 50

## 【0023】

上記ゲノムの大領域が欠失した枯草菌変異株は、枯草菌野生株 (*Bacillus subtilis* Marburg No.168；本明細書において以下、枯草菌 168 株又は単に 168 株、あるいは野生株と称する) のゲノムと比べて、そのゲノム中の大領域が欠失したゲノムを有する。すなわち、当該枯草菌変異株のゲノムにおいては、枯草菌野生株のゲノム中の、*prophage 6* (y o a V - y o b O) 領域、*prophage 1* (y b b U - y b d E) 領域、*prophage 4* (y j c M - y j d J) 領域、*PBSX* (y k d A - x l y A) 領域、*prophage 5* (y n x B - d u t) 領域、*prophage 3* (y d i M - y d j C) 領域、*spb* (y o d U - y p q P) 領域、*pks* (p k s A - y m a C) 領域、*skin* (s p o I V C B - s p o I I I C) 領域、*pps* (p p s E - p p s A) 領域、*prophage 2* (y d c L - y d e J) 領域、y d c L - y d e K - y d h U 領域、*yisB* - *yitD* 領域、*yunA* - *yurT* 領域、*cgeE* - *ypmQ* 領域、*yeeK* - *yexX* 領域、*pdp* - *rocR* 領域、*ycxB* - *sipU* 領域、*SKIN* - *Pro7* (s p o I V C B - y r a K) 領域、*sbo* - *ywhH* 領域、*yybP* - *yyaJ* 領域及び*yncM* - *fosB* 領域からなる群より選択される 1 以上の領域が欠失している。なお、領域とは特定の遺伝子に挟まれる遺伝子の領域をいい、領域が欠失しているとは特定の遺伝子に挟まれる領域の全てを欠失していることをいう。

10

## 【0024】

当該枯草菌変異株としては、好ましくは、枯草菌野生株のゲノム中の、*prophage 6* (y o a V - y o b O) 領域、*prophage 1* (y b b U - y b d E) 領域、*prophage 4* (y j c M - y j d J) 領域、*PBSX* (y k d A - x l y A) 領域、*prophage 5* (y n x B - d u t) 領域、*prophage 3* (y d i M - y d j C) 領域、*spb* (y o d U - y p q P) 領域、*pks* (p k s A - y m a C) 領域、*skin* (s p o I V C B - s p o I I I C) 領域、*pps* (p p s E - p p s A) 領域、*prophage 2* (y d c L - y d e J) 領域、y d c L - y d e K - y d h U 領域、*yisB* - *yitD* 領域、*yunA* - *yurT* 領域、*cgeE* - *ypmQ* 領域、*yeeK* - *yexX* 領域、*pdp* - *rocR* 領域、*ycxB* - *sipU* 領域、*SKIN* - *Pro7* (s p o I V C B - y r a K) 領域、*sbo* - *ywhH* 領域、*yybP* - *yyaJ* 領域及び*yncM* - *fosB* 領域の全てを欠失している MGB 874 株 (特開 2007-130013 号公報) や、枯草菌野生株のゲノム中の、*prophage 6* (y o a V - y o b O) 領域、*prophage 1* (y b b U - y b d E) 領域、*prophage 4* (y j c M - y j d J) 領域、*PBSX* (y k d A - x l y A) 領域、*prophage 5* (y n x B - d u t) 領域、*prophage 3* (y d i M - y d j C) 領域、*spb* (y o d U - y p q P) 領域、*pks* (p k s A - y m a C) 領域、*skin* (s p o I V C B - s p o I I I C) 領域、*pps* (p p s E - p p s A) 領域、*prophage 2* (y d c L - y d e J) 領域、*prophage 7* (y r k M - y r a K) 領域からなる群より選択される領域の全てを欠失している OA105 株が挙げられ、より好ましくは MGB 874 株である。

20

30

## 【0025】

上記枯草菌変異株は、例えば、168 株 (たとえば N B R C 111470 株) の任意の枯草菌株から上述のゲノム領域を欠失させることによって作製することができる。欠失させるべき目的のゲノム領域は、例えば、当該任意の枯草菌株のゲノムを、公開されている枯草菌 168 株のゲノムと対比することにより決定することができる。枯草菌 168 株の全ヌクレオチド配列及びゲノムの情報は、上述の B S O R F D B 、又は G e n B a n k : A L 0 0 9 1 2 6 . 2 ([www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/38680335]) から入手することができる。当業者は、これらの情報源から得た枯草菌 168 株のゲノム情報に基づいて、欠失させるべき目的のゲノム領域を決定することができる。ここで、欠失させるべきゲノム領域は、公開されている枯草菌 168 株における上述のゲノム領域のヌクレオチド配列に対して、1 又は数個 (例えば、1 ~ 100 個、好ましくは 1 ~ 50 個、より好ましくは 1 ~ 30 個、さらに好ましくは 1 ~ 10 個、さらにより好ましくは 1 ~ 5 個) のヌクレ

40

50

オチドにおける天然又は人工的に引き起こされた欠失、置換、挿入、付加等の変異を含むヌクレオチド配列を有するゲノム領域であり得る。あるいは、欠失させるべきゲノム領域は、公開されている枯草菌 168 株における上述のゲノム領域に対して、ヌクレオチド配列において好ましくは 80% 以上同一、さらにより好ましくは 90% 以上同一、なお好ましくは 95% 以上同一なゲノム領域であり得る。

#### 【0026】

あるいは、上記欠失させるべきゲノム領域は、表 1 に示す一対のオリゴヌクレオチドセットにより挟み込まれる領域として表すことができる。表 1 記載の領域を枯草菌ゲノム上から欠失させる方法としては、特に限定されないが、例えば S O E - P C R 法 ( s p l i c i n g b y o v e r l a p e x t e n s i o n P C R : G e n e , 1 9 8 9 , 7 7 : 6 1 - 6 8 ) 等により調製された欠失用 D N A 断片を用いた 2 重交差法が挙げられる。当該方法により枯草菌野生株から所定のゲノム領域が欠失した変異株を作製する手順は、特開 2007-130013 号公報に詳述されているが、以下に概要を説明する。

#### 【0027】

【表 1】

領域	オリゴヌクレオチドセット			
	第1オリゴヌクレオチド	配列番号	第2オリゴヌクレオチド	配列番号
prophage6 (yoAV-yob0) 領域	tgctgatatgctgcggatt	14	ACGCCACATTCTGTGTGTG	15
prophage1 (ybbU-ybdE) 領域	taagattatctaagggttg	16	CATACAAGACGGAAATT	17
prophage4 (yjcm-yjdJ) 領域	ttattaagttagcgaaaggca	18	TGCAAAAAGAGGCCACACA	19
PBSX (ykdA-xlyA) 領域	gacctgcaagtgcgtgcgtat	20	GATCTTCTCTTCGTCGC	21
prophage5 (ynxB-dut) 領域	ccataattacgttggaaatct	22	AATCACACAGCATGGAGA	23
prophage3 (ydiM-ydjC) 領域	agcgatgtgaggtgaaaatt	24	TTATTAAAGTCTACAAAT	25
spb (yodU-ypqP) 領域	atgtcattaatatcagtaca	26	GTTCACAGGAGATAACAGC	27
pks (pksA-ymaC) 領域	atcagaggaaggtataatg	28	CATTCTGTTCCAATTGT	29
skin (spoIVCB-spoIIIC) 領域	catactttgtggaggtgac	30	GAGATCCGGCTTCTTCTG	31
pps (ppsE-ppsA) 領域	cctcttattatgagaactgg	32	CTCTGTCCGCTAATCCGC	33
prophage2 (ydcL-ydeJ) 領域	gcccacaaaactgcccactta	34	TCCTATCTATTCCATGGT	35
ydcL-ydeK-ydhU 領域	gcccacaaaactgcccactta	36	GGGCAATCCGTGGAACGGGT	37
yisB-yitD 領域	gatgttaaggaggagcgat	38	CGACGAGAGCCCCGCAGCCG	39
yunA-yurT 領域	aaatttctcgacaaggaa	40	TCGAAGGAGGGAAAAACAGT	41
cgeE-ypmQ 領域	ggttgtgcaaacgcctatt	42	GGCTGGAAAGGATGGATGTC	43
yeeK-yesX 領域	atgtgaaggagagactaaat	44	CGTCTTATCCCTTAGTCCTC	45
pdp-rocr 領域	ggcgcccttcgttccgcggc	46	GATCAGGCTTCCTGCTCCGG	47
ycxB-sipU 領域	atataaaaggatcagcactg	48	CCATGTTCTTTGCATTGC	49
SKIN-Pro7 (spoIVCB-yrak) 領域	catactttgtggaggtgac	50	CATTCTGTTCCAATTGT	51
sbo-ywhH 領域	gggaggattcaattatgaaa	52	GACGATGTCTGGATGTTTT	53
yybP-yyaj 領域	ccgcgtcggtatgcatttc	54	GCAGATCCGCACTGACTTT	55
yncM-fosB 領域	gcggcttttgctgcattgt	56	CCTTATATGAAATATGGTTG	57
prophage7 (yrkM-yrak) 領域	atgtttaaaagggttttga	58	CATTCTGTTCCAATTGT	59

#### 【0028】

S O E - P C R 法による欠失用 D N A 断片の調製と当該欠失用 D N A 断片を用いた 2 重交差法による目的領域の欠失の手順の概要を図 1 に示す。初めに、S O E - P C R 法により、欠失させるべき目的領域の上流に隣接する約 0.1 ~ 3 k b 領域に対応する断片（上流断片と称する）と、同じく下流に隣接する約 0.1 ~ 3 k b 領域に対応する断片（下流断片と称する）とを連結した D N A 断片を調製する。好ましくは、目的領域の欠失を確認するために、当該上流断片と下流断片の間に薬剤耐性遺伝子などのマーカー遺伝子断片をさらに連結した D N A 断片を調製する。

10

20

30

40

50

## 【0029】

まず、1回目のPCRによって、欠失させるべき領域の上流断片A及び下流断片B、並びに必要に応じてマーカー遺伝子断片（図1中では、クロラムフェニコール耐性遺伝子断片Cm）の3断片を調製する。上流断片及び下流断片のPCR増幅の際には、後に連結される断片の末端10～30ヌクレオチドの配列を付加したプライマーを使用する。例えば、上流断片A、薬剤耐性マーカー遺伝子断片Cm、及び下流断片Bをこの順で連結せる場合、上流断片Aの下流末端に結合するプライマーの5'末端に、薬剤耐性マーカー遺伝子断片Cmの上流側10～30ヌクレオチドに相当する配列を付加し（図1、プライマーDR1）、また下流断片Bの上流末端に結合するプライマーの5'末端に、薬剤耐性マーカー遺伝子断片Cmの下流側10～30ヌクレオチドに相当する配列を付加する（図1、プライマーDF2）。このように設計したプライマーセットを用いて上流断片A及び下流断片BをPCRで増幅した場合、増幅された上流断片A'の下流側には薬剤耐性マーカー遺伝子断片Cmの上流側に相当する領域が付加されることとなり、増幅された下流断片B'の上流側には薬剤耐性マーカー遺伝子断片Cmの下流側に相当する領域が付加されることとなる。

10

## 【0030】

次に、1回目のPCRで調製した上流断片A'、薬剤耐性マーカー遺伝子断片Cm、及び下流断片B'を混合して鋳型とし、上流断片の上流側に結合するプライマー（図1、プライマーDF1）及び下流断片の下流側に結合するプライマー（図1、プライマーDR2）からなる1対のプライマーを用いて2回目のPCRを行う。この2回目のPCRにより、上流断片A、薬剤耐性マーカー遺伝子断片Cm、及び下流断片Bをこの順で結合した欠失用DNA断片Dを増幅することができる。

20

## 【0031】

上述の方法などによって得られる欠失用DNA断片を、通常の制限酵素とDNAリガーゼを用いてプラスミドに挿入し、欠失導入用プラスミドを構築する。あるいは、上流断片及び下流断片を直接連結した欠失用DNA断片を調製した後、当該欠失用DNA断片を薬剤耐性マーカー遺伝子を含むプラスミドに挿入することで、上流断片及び下流断片に加えて薬剤耐性マーカー遺伝子断片を有する欠失導入用プラスミドを構築することができる。

## 【0032】

上記手順で増幅した欠失用DNA断片あるいは構築された欠失導入用プラスミドを、コンピテントセル形質転換法等の通常の手法により、ゲノム領域を欠失させたい枯草菌に導入する。プラスミドの導入により、当該プラスミド上の上流断片及び下流断片と、枯草菌ゲノムのそれらに相同な領域との間で2重交差の相同組換えが生じ、欠失させるべき領域が薬剤耐性マーカー遺伝子に置き換えられた形質転換体が得られる（図1）。形質転換体の選択は、欠失用DNA断片中に存在する薬剤耐性遺伝子などのマーカー遺伝子の発現を指標に行えばよい。例えば、クロラムフェニコール耐性遺伝子断片で形質転換処理をした菌を、抗生物質（クロラムフェニコール等）を含む培地で培養し、生育したコロニーを回収することで、目的の領域が欠失しクロラムフェニコール耐性遺伝子に置き換えられた形質転換体を取得することができる。さらに、形質転換体のゲノムDNAを抽出し、これを鋳型としてPCRを行うことで、目的の領域が欠失されていることを確認することができる。

30

## 【0033】

次に、得られた形質転換体から、ゲノムDNAに挿入された上記マーカー遺伝子を除去する。除去の手順としては、特に限定されないが、図2に示すような2段階相同組換え法を用いることができる（特開平2009-254350号公報）。当該方法では、初めに第1相同組換えのためのDNA断片（供与体DNA）を調製する。調製の方法としては、特に限定されないが、上述したSOE-PCR法等が挙げられる。供与体DNAとしては、例えば、除去すべきマーカー遺伝子領域（すなわち、欠失された領域）の上流に隣接する領域に対応する約0.1～3kb断片（上流断片）及び同じく下流に隣接する領域に対応する約0.1～3kb断片（下流断片）が結合した断片と、当該除去すべきマーカー遺

40

50

伝子下流領域の断片とが連結したDNA断片を用いることができる。好適には、当該下流断片と除去すべき第1のマークー遺伝子下流領域断片との間に、相同組換えの指標となる第2のマークー遺伝子等が挿入されたDNA断片が用いられる(図2を参照)。

【0034】

次いで、調製された供与体DNAをコンピテントセル形質転換法等の通常の手法によって上記形質転換体に導入し、当該形質転換体ゲノム上の当該上流断片及び第1のマークー遺伝子下流領域に相当する領域との間に相同組換えを起こさせる(第1相同組換え)。所望の相同組換えが生じた形質転換体は、供与体DNA中に挿入した第2のマークー遺伝子の発現を指標に選択することができる。第1相同組換えが適切に生じた形質転換体のゲノムDNAでは、上流断片、下流断片、必要に応じて第2のマークー遺伝子、第1のマークー遺伝子下流領域、及び下流断片が順番に配置している(図2参照)。このような配置を有するゲノムDNAにおいては、上記2つの下流断片同士の間で自然誘発的に相同組換えが起こり得る(ゲノム内相同組換え)。このゲノム内相同組換えによって、当該2つの下流断片の間に位置していた領域が消失することにより、第1のマークー遺伝子が形質転換体ゲノムから除去される。

10

【0035】

ゲノム内相同組換えを起こした形質転換体を選択する手段としては、第1のマークー遺伝子が薬剤耐性遺伝子の場合は、薬剤耐性を持たない菌を選択する方法が挙げられる。ペニシリリン系抗生物質は、増殖細胞に対して殺菌的に作用するが非増殖細胞には作用しない。したがって、薬剤とペニシリリン系抗生物質の存在下で菌を培養すれば、薬剤存在下で増殖しない薬剤非耐性菌を選択的に濃縮することができる(Methods in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Labs, 1970)。別の手段としては、致死遺伝子を導入する方法が挙げられる。例えば、上記第2のマークーとしてchpA(mazF)遺伝子等の致死遺伝子を菌に導入すれば、ゲノム内相同組換えが起らなかった菌は当該致死遺伝子の作用で死滅するので、ゲノム内相同組換えを起こした形質転換体を選択することができる。選択された菌株からゲノムDNAを抽出し、これを鋳型としてPCRを行うことで、目的の領域が消失していることを確認することができる(特開2009-254350号公報)。

20

【0036】

以上のようにして、ゲノム上の所定の領域を消失した枯草菌変異株を作製することができる。さらに、当該手順を繰り返すことにより、上述のゲノム領域が全て消失した枯草菌変異株を作製することができる。

30

【0037】

(1-2.ジピコリン酸シンターゼ遺伝子発現強化)

本発明においては、上記所定の領域を消失した枯草菌変異株において、枯草菌ジピコリン酸シンターゼ遺伝子の発現が強化されている。

40

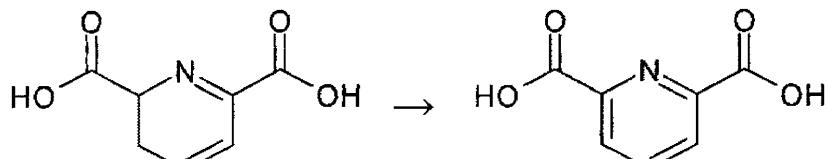
【0038】

本明細書において、ジピコリン酸シンターゼ遺伝子とは、下記式(1)の化学反応を行なせる活性を有するジピコリン酸シンターゼをコードする遺伝子であり、枯草菌ジピコリン酸シンターゼ遺伝子及びそれに相当する遺伝子が包含される。

【0039】

【化1】

式(1)



50

## 【0040】

ジピコリン酸シンターゼは、サブユニットAとサブユニットBから構成されており、それぞれのサブユニットをコードする遺伝子が存在する。枯草菌ジピコリン酸シンターゼ遺伝子としては、ジピコリン酸シンターゼ・サブユニットAをコードするsp oVFAと、ジピコリン酸シンターゼ・サブユニットBをコードするsp oVFBが挙げられる。枯草菌sp oVFA遺伝子のヌクレオチド配列及び当該sp oVFA遺伝子によりコードされるジピコリン酸シンターゼ・サブユニットAのアミノ酸配列をそれぞれ配列番号1及び2に示す。また、枯草菌sp oVFB遺伝子のヌクレオチド配列及び当該sp oVFB遺伝子によりコードされるジピコリン酸シンターゼ・サブユニットBのアミノ酸配列をそれぞれ配列番号3及び4に示す。

10

## 【0041】

枯草菌ジピコリン酸シンターゼ遺伝子に相当する遺伝子としては、枯草菌sp oVFA遺伝子と少なくとも80%、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、より好ましくは96%以上、より好ましくは97%以上、より好ましくは98%以上、より好ましくは99%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、且つ枯草菌ジピコリン酸シンターゼ・サブユニットBとともに働く上述したジピコリン酸合成反応を触媒する活性(ジピコリン酸シンターゼ活性)を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチドが挙げられる。

## 【0042】

あるいは、枯草菌ジピコリン酸シンターゼ遺伝子に相当する遺伝子としては、枯草菌sp oVFB遺伝子と少なくとも80%、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、より好ましくは96%以上、より好ましくは97%以上、より好ましくは98%以上、より好ましくは99%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、且つ枯草菌ジピコリン酸シンターゼ・サブユニットAとともに働く上述したジピコリン酸合成反応を触媒する活性(ジピコリン酸シンターゼ活性)を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチドが挙げられる。

20

## 【0043】

さらに、枯草菌ジピコリン酸シンターゼ遺伝子に相当する遺伝子としては、枯草菌以外の微生物由来のジピコリン酸シンターゼ・サブユニットA又はBをコードする遺伝子が挙げられる。そのような遺伝子の例としては、*Bacillus licheniformis*由来のsp oVFA(配列番号5)及びsp oVFB(配列番号6)、*Bacillus clausii*由来のsp oVFA(配列番号7)及びsp oVFB(配列番号8)、*Clostridium stercorarium*由来のsp oVFA(配列番号9)及びsp oVFB(配列番号10)、ならびに*Bacillus amyloli quefaciens*由来のsp oVFA(配列番号11)及びsp oVFB(配列番号12)等を挙げることができる。

30

## 【0044】

本発明の枯草菌変異株においては、上述したジピコリン酸シンターゼ遺伝子のうちのいずれか1つ、又はいずれか2つ以上が発現強化されていればよい。好ましくは、上述した枯草菌ジピコリン酸シンターゼのサブユニットAをコードする遺伝子又はこれに相当する遺伝子と、上述した枯草菌ジピコリン酸シンターゼのサブユニットBをコードする遺伝子又はこれに相当する遺伝子とが組み合わせて発現強化されているとよい。より好ましくは、上述した枯草菌ジピコリン酸シンターゼのサブユニットAとサブユニットBをコードする遺伝子とが組み合わせて発現強化されているとよい。

40

## 【0045】

本発明の枯草菌変異株において発現強化される枯草菌ジピコリン酸シンターゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子の好ましい例としては、以下の(i)及び(ii)に記載の遺伝子からなる群より選択される少なくとも1つが挙げられる。

(i) 下記(a)~(f)からなる群より選択される少なくとも1つの枯草菌ジピコリン酸シンターゼ・サブユニットA遺伝子又はこれに相当する遺伝子:

(a) 配列番号1に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド;

50

(b) 配列番号1に示すヌクレオチド配列と少なくとも80%、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、より好ましくは96%以上、より好ましくは97%以上、より好ましくは98%以上、より好ましくは99%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、且つ(ii)に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c) 配列番号1に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドの相補鎖に対してストリンジェントな条件下ハイブリダイズし、且つ(ii)に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(d) 配列番号2に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(e) 配列番号2に示すアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、且つ(ii)に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチドであって、数個とは59個、好ましくは44個、より好ましくは29個、より好ましくは14個、より好ましくは5個、より好ましくは2個である；及び、

(f) 配列番号2に示すアミノ酸配列と少なくとも80%、好ましくは80%以上、より好ましくは85%、より好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、より好ましくは99%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ(ii)に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(ii) 下記(j)～(o)からなる群より選択される少なくとも1つの枯草菌ジピコリン酸シンターゼ・サブユニットB遺伝子又はこれに相当する遺伝子：

(j) 配列番号3に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

(k) 配列番号3に示すヌクレオチド配列と少なくとも80%、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、より好ましくは96%以上、より好ましくは97%以上、より好ましくは98%以上、より好ましくは99%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、且つ(i)に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(l) 配列番号3に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドの相補鎖に対してストリンジェントな条件下ハイブリダイズし、且つ(i)に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(m) 配列番号4に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(n) 配列番号4に示すアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、且つ(i)に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチドであって、数個とは40個、好ましくは30個、より好ましくは20個、より好ましくは10個、より好ましくは4個、より好ましくは2個である；及び、

(o) 配列番号4に示すアミノ酸配列と少なくとも80%、好ましくは80%以上、より好ましくは85%、より好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、より好ましくは99%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ(i)に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

#### 【0046】

より好ましくは、本発明の枯草菌変異株においては、上記(i)及び(ii)に記載の遺伝子が組み合わせて発現強化される。さらに好ましくは、本発明の枯草菌変異株において

10

20

30

40

50

は、上記(i)(a)の遺伝子と、上記(ii)(j)～(o)の遺伝子からなる群より選択される少なくとも1つとの組み合わせ、又は上記(i)(a)～(f)の遺伝子からなる群より選択される少なくとも1つと、上記(ii)(j)の遺伝子との組み合わせが発現強化される。なお好ましくは、本発明の枯草菌変異株においては、上記(i)(a)の遺伝子と上記(ii)(j)の遺伝子との組み合わせが発現強化される。

#### 【0047】

本発明の枯草菌変異株において発現強化されるジピコリン酸シンターゼ遺伝子の別の好ましい例としては、上述した枯草菌のsp o VFA遺伝子及びsp o VF B遺伝子、*Bacillus licheniformis*のsp o VFA遺伝子及びsp o VF B遺伝子、*Bacillus clausii*のsp o VFA遺伝子及びsp o VF B遺伝子、*Clostridium stercorarium*のsp o VFA遺伝子及びsp o VF B遺伝子、ならびに*Bacillus amyloliquefaciens*のsp o VFA遺伝子及びsp o VF B遺伝子からなる群より選択される少なくとも1つが挙げられ、このうち、枯草菌sp o VFA遺伝子及び枯草菌sp o VF B遺伝子からなる群より選択される少なくとも1つがより好ましい。

10

#### 【0048】

本発明の枯草菌変異株において発現強化されるジピコリン酸シンターゼ遺伝子のなお別の好ましい例としては、枯草菌のsp o VFA遺伝子、*Bacillus licheniformis*のsp o VF A遺伝子、*Bacillus clausii*のsp o VFA遺伝子、*Clostridium stercorarium*のsp o VFA遺伝子、及び*Bacillus amyloliquefaciens*のsp o VFA遺伝子からなる群より選択される少なくとも1つと、枯草菌のsp o VF B遺伝子、*Bacillus licheniformis*のsp o VF B遺伝子、*Bacillus clausii*のsp o VF B遺伝子、*Clostridium stercorarium*のsp o VF B遺伝子、及び*Bacillus amyloliquefaciens*のsp o VF B遺伝子からなる群より選択される少なくとも1つとの組み合わせが挙げられ、このうち、枯草菌sp o VFA遺伝子と枯草菌sp o VF B遺伝子との組み合わせがより好ましい。

20

#### 【0049】

本発明において、ジピコリン酸シンターゼ遺伝子の発現強化とは、改変前と比較して当該遺伝子の発現を増強させることを意味する。上記ジピコリン酸シンターゼ遺伝子の発現を強化する手段としては、例えば、宿主ゲノム上の枯草菌ジピコリン酸シンターゼ遺伝子を、野生型に比較し該遺伝子の発現を強化できる制御領域（強発現制御領域）の制御下に配置すること、及び制御領域、好ましくは強発現制御領域の制御下に配置された枯草菌ジピコリン酸シンターゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子を、宿主が本来有するジピコリン酸シンターゼ遺伝子に加えて、細胞内のゲノム中若しくはプラスミド中に導入すること、などが挙げられる。

30

#### 【0050】

例えば、本発明の枯草菌変異株は、上述のゲノム領域が1つ以上、好ましくは全て欠失した枯草菌変異株を宿主として、そのゲノム上の枯草菌ジピコリン酸シンターゼ遺伝子の制御領域配列を強発現制御領域に置換することによって作製することができる。あるいは、本発明の枯草菌変異株は、強発現制御領域の制御下に配置された枯草菌ジピコリン酸シンターゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子を当該宿主のゲノム中若しくはプラスミド中に導入することによって作製することができる。またあるいは、複数の枯草菌ジピコリン酸シンターゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子を当該宿主中に作動可能に存在させる改変により、該目的遺伝子の発現を強化することもできる。

40

#### 【0051】

ジピコリン酸シンターゼ遺伝子の発現強化のための詳細な手順の例を以下に記載する。まず、制御領域及びジピコリン酸シンターゼ遺伝子が、当該制御領域の制御下に当該遺伝子が発現されるように配置され、さらに宿主ゲノムとの相同領域と結合されたDNA断片として構築され得る。例えば、上流から、制御領域（例えば、後述するsp o VG遺伝子制御領域）、ジピコリン酸シンターゼ・サブユニットA遺伝子、ジピコリン酸シンターゼ・サブユニットB遺伝子の順で配置した断片を作製し、さらにその断片に宿主ゲノムの一部との相同領域を結合してDNA断片を調製する。次いで、このDNA断片を上述した宿

50

主に導入すれば、宿主ゲノム中に当該DNA断片が挿入されて、宿主を形質転換することができる。形質転換法としては、宿主となる枯草菌に応じて適切な、且つ一般的な方法を採用することができる。得られた形質転換体は、形質転換前の宿主と比べてジピコリン酸シンターゼ遺伝子を多数保有しているため、該遺伝子の発現量が増加する。

#### 【0052】

本発明においてジピコリン酸シンターゼ遺伝子の発現強化に使用され得る制御領域しては野生型の制御領域に比較して、発現を増強することができる制御領域であれば特に限定されず、バシラス属細菌由来の<sup>10</sup> -アミラーゼ遺伝子の制御領域、プロテアーゼ遺伝子の制御領域、リボソームタンパク質をコードする遺伝子(rplS遺伝子等)の制御領域、aprE遺伝子の制御領域、又はspoVG遺伝子の制御領域; Bacillus sp. KSM-S237株のセルラーゼ遺伝子の制御領域; Staphylococcus aureus由來のカナマイシン耐性遺伝子の制御領域、又はクロラムフェニコール耐性遺伝子の制御領域等(いずれも、特開2009-089708号公報を参照)が例示される。

#### 【0053】

(1-3. ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ遺伝子の欠失又は不活性化)

本発明の枯草菌変異株においては、pckA遺伝子が欠失又は不活性化されている。

#### 【0054】

枯草菌pckA遺伝子はホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼをコードする遺伝子である。

枯草菌においてホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ(PckA)はATPの加水分解エネルギーを利用し、オキサロ酢酸(OAA)を脱炭酸してホスホエノールピルビン酸(PEP)の合成を触媒する酵素で、糖新生に必須な酵素である。<sup>20</sup> pckA遺伝子のBSORF DBにおける登録番号、コードするタンパク質及びその機能を以下の表2に示す。当業者は、当該BSORF DBの情報に基づいて、親株における上記遺伝子を同定することができる。

すなわち、本発明においてホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ遺伝子は配列番号13に示すヌクレオチド配列と少なくとも90%以上、より好ましくは95%以上、より好ましくは96%以上、より好ましくは97%以上、より好ましくは98%以上、より好ましくは99%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチドとして同定することができる。<sup>30</sup>

#### 【0055】

【表2】

遺伝子名	遺伝子番号 (BSORF DB)	コードするタンパク質	
		名称	機能
pckA	BG11841 (配列番号13)	PckA	phosphoenolpyruvate carboxykinase

#### 【0056】

遺伝子を欠失又は不活性化させる手段としては、該遺伝子のヌクレオチド配列上の1つ以上のヌクレオチドに対する突然変異導入、又は該ヌクレオチド配列に対する別のヌクレオチド配列の置換若しくは挿入、あるいは該遺伝子の配列の一部若しくは全部の削除などが挙げられる。遺伝子の転写を阻害する変異を導入する手段としては、該遺伝子のプロモーター領域に対する突然変異導入や、別のヌクレオチド配列での置換若しくは挿入による、当該プロモーターの不活性化が挙げられる。上記突然変異導入や、ヌクレオチド配列の置換若しくは挿入のための具体的な手法としては、紫外線照射、部位特異的変異導入、及び上記(1-1. ゲノム領域欠失枯草菌変異株)にて説明したSOE-PCR法や相同組

10

20

30

40

50

換え法、などを挙げることができる。欠失又は不活性化させる遺伝子の枯草菌ゲノム上の位置やスクレオチド配列は、上述した B S O R F DB にて確認することができる。

#### 【0057】

##### (2. 枯草菌変異株を用いた DPA 生産)

本発明の枯草菌変異株は、後記実施例に示すように、変異前の親枯草菌株に比べて極めて高いDPA生産能を有している(実施例2参照)。

したがって、上述した枯草菌変異株を培養することによって当該菌体外に効率よくDPAを生産することができ、本発明の別の態様は、上述した枯草菌変異株を用いるDPA又はその塩の製造方法に係るものである。

#### 【0058】

本発明のDPA又はその塩の製造方法においては、先ず、上記本発明の枯草菌変異株を培養する。培養する方法に特に制限はなく、通常の微生物の培養方法を用いることができる。すなわち、使用する培地は、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じその他の有機成分を含む通常の培地である。炭素源としては、グルコース、ラクトース、ガラクトース、フラクトースやでんぶん及びセルロースの加水分解物、糖蜜等の糖類、グリセロール、エタノール、ソルビトール等のアルコール類、フマル酸、クエン酸、コハク酸等の有機酸を用いることができる。窒素源として硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物等の有機窒素、アンモニアガス、アンモニア水、尿素、グルタミン酸、リジン、グリシン、アラニン、メチオニン、アスパラギン酸、アルギニン等を用いることができる。有機微量栄養源として、ビタミン類、アミノ酸等の要求物質、又は、必要に応じて酵母エキス、コーンスティーブリカーゼ等を含有させることができ。これらの他に、必要に応じて、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、塩化カルシウム、塩化ナトリウム、銅イオン、鉄イオン、マンガンイオン等を添加することが望ましい。場合によっては、消泡剤等も添加される。

10

20

30

40

#### 【0059】

培地のpHは、枯草菌が生育し得る範囲、好ましくは6.0~8.0に調節すればよく、pHの調整は、無機又は有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行えばよい。培養は、15~42、好ましくは28~37で、6~96時間、好ましくは2~4日間を行い、必要により通気や攪拌を加えてもよい。

#### 【0060】

以上のように、本発明の枯草菌変異株を培養することによって、培養上清中にDPAが生産される。あるいは、上記のように培養した微生物を、アスパラギン酸及び/又はピルビン酸を含む水溶液中に懸濁させることで、反応上清液中にDPAを産生させることも可能である。このとき、エネルギー源として上記培地に添加されるような物質を共存させることで、さらに効率よくDPAを産生させることが可能である。

#### 【0061】

次いで、生産されたDPAを、培養物中から回収する。DPAの回収は、公知の方法に従って行うことができる。例えば、上記培養上清又は反応上清液からのDPAの単離は、公知の方法、例えばイオン交換樹脂による吸脱着、晶析による固液分離、膜処理による不純物の除去等、又はそれらを組み合わせることで実施することができる。この方法により、容易にジピコリン酸の結晶又は沈殿を得ることができる。

#### 【0062】

また、上記イオン交換樹脂処理などによって得られたDPAを含有する溶液に、目的に応じた量のアルカリを添加することで、DPAの塩を得ることができる。具体的な例としては、NaOH又はKOH等を添加することにより、それぞれジピコリン酸ナトリウム塩又はジピコリン酸カリウム塩等を得ることができる。

#### 【0063】

本発明の例示的実施形態として、さらに以下の組成物及び製造方法を本明細書に開示する。但し、本発明はこれらの実施形態に限定されない。

#### 【0064】

50

< 1 > 枯草菌変異株であって、

prophage 6 領域、prophage 1 領域、prophage 4 領域、PBS X 領域、prophage 5 領域、prophage 3 領域、spb 領域、pks 領域、skin 領域、pps 領域、prophage 2 領域、ydcL - ydeK - ydhU 領域、ysisB - yitD 領域、yunA - yurt 領域、cgeE - ypmQ 領域、yeek - yesX 領域、pdprrocR 領域、ycxB - siPU 領域、SKIN - Pro7 領域、sbo - ywhH 領域、yybP - yyaj 領域及びyncM - fosB 領域からなる群より選択される 1 以上の領域が欠失したゲノムを有し、

ジピコリン酸シンターゼ遺伝子の発現が強化されており、且つホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ遺伝子が欠失又は不活性化されている、枯草菌変異株。

10

#### 【0065】

< 2 > 枯草菌変異株の製造方法であって、

prophage 6 領域、prophage 1 領域、prophage 4 領域、PBS X 領域、prophage 5 領域、prophage 3 領域、spb 領域、pks 領域、skin 領域、pps 領域、prophage 2 領域、ydcL - ydeK - ydhU 領域、ysisB - yitD 領域、yunA - yurt 領域、cgeE - ypmQ 領域、yeek - yesX 領域、pdprrocR 領域、ycxB - siPU 領域、SKIN - Pro7 領域、sbo - ywhH 領域、yybP - yyaj 領域及びyncM - fosB 領域からなる群より選択される 1 以上の領域が欠失したゲノムを有する枯草菌変異株において

ジピコリン酸シンターゼ遺伝子の発現を強化し、且つホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ遺伝子を欠失又は不活性化することを含む、方法。

20

#### 【0066】

< 3 > 上記 < 1 > ~ < 2 > のいずれか 1 において、好ましくは、上記枯草菌変異株は、prophage 6 領域、prophage 1 領域、prophage 4 領域、PBS X 領域、prophage 5 領域、prophage 3 領域、spb 領域、pks 領域、skin 領域、pps 領域、prophage 2 領域、ydcL - ydeK - ydhU 領域、ysisB - yitD 領域、yunA - yurt 領域、cgeE - ypmQ 領域、yeek - yesX 領域、pdprrocR 領域、ycxB - siPU 領域、SKIN - Pro7 領域、sbo - ywhH 領域、yybP - yyaj 領域及びyncM - fosB 領域が欠失したゲノムを有する。

30

#### 【0067】

< 4 > 上記 < 1 > ~ < 3 > のいずれかにおいて、好ましくは、上記各領域は、表 1 に記載の各オリゴヌクレオチドセットにより挿まれる領域である。

#### 【0068】

< 5 > 上記 < 1 > ~ < 4 > のいずれかにおいて、好ましくは、上記ジピコリン酸シンターゼ遺伝子は、下記 (i) 及び (ii) に記載の遺伝子からなる群より選択される少なくとも 1 つである：

(i) 下記 (a) ~ (f) からなる群より選択される少なくとも 1 つの枯草菌ジピコリン酸シンターゼ・サブユニット A 遺伝子又はこれに相当する遺伝子：

(a) 配列番号 1 に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

(b) 配列番号 1 に示すヌクレオチド配列と 80 % 以上、より好ましくは 90 % 以上、より好ましくは 95 % 以上、より好ましくは 96 % 以上、より好ましくは 97 % 以上、より好ましくは 98 % 以上、より好ましくは 99 % 以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、且つ (ii) に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

40

(c) 配列番号 1 に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドの相補鎖に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つ (ii) に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(d) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオ

50

チド；

(e) 配列番号2に示すアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、且つ(iii)に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチドであって、数個とは59個、好ましくは44個、より好ましくは29個、より好ましくは14個、より好ましくは5個、より好ましくは2個である；

(f) 配列番号2に示すアミノ酸配列と80%以上、より好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、より好ましくは96%以上、より好ましくは97%以上、より好ましくは98%以上、より好ましくは99%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ(iii)に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(ii) 下記(j)～(o)からなる群より選択される少なくとも1つの枯草菌ジピコリン酸シンターゼ・サブユニットB遺伝子又はこれに相当する遺伝子：

(j) 配列番号3に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

(k) 配列番号3に示すヌクレオチド配列と80%以上、より好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、より好ましくは96%以上、より好ましくは97%以上、より好ましくは98%以上、より好ましくは99%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、且つ(i)に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(l) 配列番号3に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドの相補鎖に対してストリンジェントな条件下ハイブリダイズし、且つ(i)に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(m) 配列番号4に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(n) 配列番号4に示すアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、且つ(i)に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチドであって、数個とは40個、好ましくは30個、より好ましくは20個、より好ましくは10個、より好ましくは4個、より好ましくは2個である；

(o) 配列番号4に示すアミノ酸配列と80%以上、より好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、より好ましくは96%以上、より好ましくは97%以上、より好ましくは98%以上、より好ましくは99%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ(i)に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

#### 【0069】

<6>上記<5>において、好ましくは、上記ジピコリン酸シンターゼ遺伝子は、以下の遺伝子である：

上記(i)記載の遺伝子からなる群より選択される少なくとも1つと、上記(iii)記載の遺伝子からなる群より選択される少なくとも1つとの組み合わせ；

上記(i)(a)の遺伝子と、上記(ii)(j)～(o)の遺伝子からなる群より選択される少なくとも1つとの組み合わせ；

上記(i)(a)～(f)の遺伝子からなる群より選択される少なくとも1つと、上記(ii)(j)の遺伝子との組み合わせ；又は

上記(i)(a)の遺伝子と上記(ii)(j)の遺伝子との組み合わせ。

#### 【0070】

<7>上記<1>～<6>のいずれかにおいて、上記ジピコリン酸シンターゼ遺伝子は：

好ましくは、枯草菌のspovFA遺伝子及びspovFB遺伝子、BacilluslicheniformisのspovFA遺伝子及びspovFB遺伝子、BacillusclausiiのspovFA

10

20

30

40

50

遺伝子及び s p o V F B 遺伝子、*Clostridium stercorarium*の s p o V F A 遺伝子及び s p o V F B 遺伝子、ならびに*Bacillus amyloliquefaciens*の s p o V F A 遺伝子及び s p o V F B 遺伝子からなる群より選択される少なくとも 1 つである；

より好ましくは、枯草菌 s p o V F A 遺伝子及び枯草菌 s p o V F B 遺伝子からなる群より選択される少なくとも 1 つである。

#### 【0071】

<8> 上記<7>において、上記ジピコリン酸シンターゼ遺伝子は：

好ましくは、枯草菌の s p o V F A 遺伝子、*Bacillus licheniformis*の s p o V F A 遺伝子、*Bacillus clausii*の s p o V F A 遺伝子、*Clostridium stercorarium*の s p o V F A 遺伝子、及び*Bacillus amyloliquefaciens*の s p o V F A 遺伝子からなる群より選択される少なくとも 1 つと、枯草菌の s p o V F B 遺伝子、*Bacillus licheniformis*の s p o V F B 遺伝子、*Bacillus clausii*の s p o V F B 遺伝子、*Clostridium stercorarium*の s p o V F B 遺伝子、及び*Bacillus amyloliquefaciens*の s p o V F B 遺伝子からなる群より選択される少なくとも 1 つの組み合わせである；

より好ましくは、枯草菌 s p o V F A 遺伝子及び枯草菌 s p o V F B 遺伝子との組み合わせである。

#### 【0072】

<9> 上記<1>～<8>のいずれかにおいて、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ遺伝子は、配列番号 13 に示すヌクレオチド配列又は配列番号 13 に示すヌクレオチド配列と少なくとも 90 % 以上、より好ましくは 95 % 以上、より好ましくは 96 % 以上、より好ましくは 97 % 以上、より好ましくは 98 % 以上、より好ましくは 99 % 以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチドからなる。

#### 【0073】

<10> 上記<1>～<9>のいずれかにおいて、好ましくは、上記ジピコリン酸シンターゼ遺伝子の発現の強化が、以下からなる群より選択される制御領域の制御下に配置された当該遺伝子の、ゲノム中又はプラスミド中への導入である：

バシラス属細菌由来の - アミラーゼ遺伝子の制御領域、プロテアーゼ遺伝子の制御領域、リボソームタンパク質をコードする遺伝子 ( r p l S 遺伝子等 ) の制御領域、a p r E 遺伝子の制御領域、又は s p o V G 遺伝子の制御領域；*Bacillus sp . K S M - S 2 3 7* 株のセルラーゼ遺伝子の制御領域；及び、*Staphylococcus aureus*由来のカナマイシン耐性遺伝子の制御領域又はクロラムフェニコール耐性遺伝子の制御領域。

#### 【0074】

<11> 上記<1>及び<3>～<10>のいずれかに記載の枯草菌変異株を用いるジピコリン酸又はその塩の製造方法。

#### 【0075】

<12> 上記<2>～<10>のいずれかに記載の方法で製造された枯草菌変異株を用いるジピコリン酸又はその塩の製造方法。

#### 【0076】

<13> 上記枯草菌変異株を培養することと、培養物中からジピコリン酸を回収することとを含む、<11>又は<12>記載の方法。

#### 【実施例】

#### 【0077】

以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、本発明の技術的範囲は以下の実施例に限定されるものではない。

#### 【0078】

##### (実施例 1) 菌株の構築

###### (1-1) トリプトファン要求性解除株の作製

枯草菌野生株ゲノムの大領域が欠失した枯草菌変異株 ( M G B 8 7 4 株；特開 2007-130013 号公報 ) におけるトリプトファン要求性を解除した。枯草菌変異株 M G B

10

20

30

40

50

874株の元株である枯草菌168株は、遺伝子型として $\text{trpC}2$ を所持している。つまり168株はトリプトファン合成に関するインドール-3-グリセロールリン酸シンターゼをコードする $\text{trpC}$ 遺伝子変異のためトリプトファン合成要求性である。また、枯草菌ATCC6051T株はトリプトファン非要求性であることが知られている(A. L. Bertini, A. M. & Galizzi, A. Microbiology, 1999, 145 (Pt 12): 3319-3320)。枯草菌168株とATCC6051T株の $\text{trpC}$ 遺伝子を比較したところ、328番目から330番目のヌクレオチドATTが枯草菌168株では存在しないことがわかった。そこで、ATCC6051T株ゲノムを鋳型とし、表3記載のプライマー $\text{trpC}_F1$ (配列番号60)及び $\text{trpC}_R1$ (配列番号61)を用いてPCRを行い、PCR産物を構築した。このPCR産物を用いて枯草菌変異株MGB874株をコンピテント法で形質転換し、トリプトファン非添加のSMA寒天培地(0.2%硫酸アンモニウム、1.4%リン酸水素2カリウム、0.6%リン酸2水素カリウム、0.1%クエン酸3ナトリウム-2水和物、0.5%グルコース、0.035%硫酸マグネシウム7水和物、1.5%寒天)に生育したコロニーを形質転換体として分離した。こうしてトリプトファン非要求性MGB874T株を得た。

10

20

30

40

50

## 【0079】

(1-2)ジピコリン酸シンターゼ遺伝子が発現強化された枯草菌変異株(MGB874T\_PspoVG-spoVFAB株)の構築

上記(1-1)で構築したMGB874T株を宿主として、ジピコリン酸シンターゼ遺伝子が発現強化された枯草菌変異株(MGB874T\_PspoVG-spoVFAB株)の構築を行った。枯草菌168株から抽出したゲノムDNAを鋳型とし、表3記載のプライマー $\text{spoVFA}_F1$ (配列番号62)及び $\text{spoVFA}_R1$ (配列番号63)を用いて、断片(A)をPCRにより増幅した。この断片(A)は $\text{spoVFA}$ 遺伝子(配列番号1)の開始コドンの上流に隣接する領域である。また、同ゲノムDNAを鋳型とし、表3記載のプライマー $\text{spoVFA}_F2$ (配列番号64)及び $\text{spoVFA}_R2$ (配列番号65)を用いて、断片(B)をPCRにより増幅した。この断片(B)は、 $\text{spoVFA}$ 遺伝子の開始コドンから下流の領域である。さらに、同ゲノムDNAを鋳型とし、表3記載のプライマー $\text{spoVG}_F$ (配列番号66)及び $\text{spoVG}_R$ (配列番号67)を用いて、 $\text{spoVG}$ 制御領域配列を含む断片(C)をPCRにより増幅した。さらに、プラスミドpDLT3(Morimoto, T. et al., Microbiology, 2002, Pt 11: 3539-3552)を鋳型とし、表3記載のプライマー $\text{Cm}_F$ (配列番号68)及び $\text{Cm}_R$ (配列番号69)を用いて、クロラムフェニコール耐性遺伝子とその制御領域を含む断片(D)をPCRにより増幅した。

次に、得られた断片(A)、断片(D)、断片(C)及び断片(B)をこの順となる様に表3記載のプライマー $\text{spoVFA}_F1$ (配列番号62)及び $\text{spoVFA}_R2$ (配列番号65)を用いてSOE-PCR法によって結合させ、約2.2kbのDNA断片を得た。得られたDNA断片を用いて、コンピテント法(J. Bacteriol., 1960, 81: 741-746)により枯草菌MGB874T株の形質転換を行い、クロラムフェニコールを含むLB寒天培地上に生育したコロニーを形質転換体として分離した(以下、分離した形質転換体をMGB874T\_PspoVG-spoVFAB株と称する)。MGB874T\_PspoVG-spoVFAB株は、生来の $\text{spoVFA}$ 遺伝子が導入した $\text{spoVG}$ の制御により、 $\text{spoVFA}$ 遺伝子の発現が強化された枯草菌変異株である。

PCR及びそれに続くサンガー法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982, 74: 5463-5467)によるシークエンシングによって、構築したMGB874T\_PspoVG-spoVFAB株のゲノム上の $\text{spoVFA}$ 制御領域と $\text{spoVFA}$ 遺伝子の間に、クロラムフェニコール耐性遺伝子及び $\text{spoVG}$ 遺伝子制御領域が挿入されていることを確認した。本実施例で得られた枯草菌変異株へのジピコリン酸シンターゼ遺伝子の導入手順及び導入位置を図3に示す。

## 【0080】

(1-3)pckA遺伝子が欠失された枯草菌変異株(MGB874T\_PspoVG-spoVFAB\_pckA株)の構築

上記(1-2)で構築したMGB874T\_PspoVG-spoVFAB株を宿主として、pckA遺伝子が欠失された枯草菌変異株(MGB874T\_PspoVG-spoVFAB\_pckA株)の構築を行った。

図1に示したように、枯草菌874株ゲノム中のpckA遺伝子(Nature, 390, 249-256, 1997, JAFAN: Japan Functional Analysis Network for Bacillus subtilis (BSORF DB, <http://bacillus.genome.ad.jp/>))を薬剤耐性遺伝子(エリスロマイシン耐性遺伝子)に置換して欠失株を作製した。枯草菌874株から抽出したゲノムDNAを鑄型とし、表3に示したpckA FW(配列番号70)及びpckA/EmR(配列番号71)のプライマーセットを用いて、ゲノム中のpckA遺伝子の上流に隣接する1.0kb断片(A)をPCRにより増幅した。また、上記ゲノムDNAを鑄型とし、pckA/EmF(配列番号72)及びpckARV(配列番号73)のプライマーセットを用いて、ゲノム中のpckA遺伝子の下流に隣接する1.0kb断片(B)をPCRにより増幅した。更に、プラスミドpMutin3(Microbiology, 144, 3097-3104, 1998)鑄型とし、表3に示したemf2(配列番号74)及びemr2(配列番号75)のプライマーセットを用いて、1.3kbのエリスロマイシン(Em)耐性遺伝子領域(C)をPCRにより調製した。

## 【0081】

次に、得られた1.0kb断片(A)、1.0kb断片(B)及びEm耐性遺伝子領域(C)の3断片を混合して鑄型として、表3に示すpckA FW2(配列番号76)及びpckARV2(配列番号77)のプライマーセットを用いたSOE(sPLICING by overlap extension)-PCR法(Gene, 77, 61, 1989)によって、3断片が(A)、(C)、(B)の順で含まれる3.3kbのDNA断片(D)を得た。

## 【0082】

更に、得られたDNA断片(D)を用いて、コンピテントセル形質転換法により(1-2)で構築したジピコリン酸シンターゼ遺伝子が発現強化された枯草菌変異株(MGB874T\_PspoVG-spoVFAB株)の形質転換を行った。形質転換後、エリスロマイシン(2μg/mL)を含むLB寒天培地上に生育したコロニーを形質転換体として分離した。

## 【0083】

得られた形質転換体のゲノムDNAを抽出し、PCRによってpckA遺伝子がEm耐性遺伝子で置換されていることを確認した。以上の操作により、pckA遺伝子が欠失された枯草菌変異株(MGB874T\_PspoVG-spoVFAB\_pckA株と称する)を構築した。

## 【0084】

10

20

30

【表3】

プライマー	配列 (5' → 3')	配列番号
trpC_F1	TATTCAAGTGAATCGATCAGCGTATG	60
trpC_R1	CTATTCAAACCACTCCCGAAAAGGT	61
spoVFA-F1	GAAGCTTAATGCTGAGCTTAG	62
spoVFA-R1	GCTCTTCTGGTGGAGTCTATCCTATTTACTCTTGTCGAGGAGGC	63
spoVFA-F2	GGCGAAAAGGAGGGAAAATAATGTTAACCGGATTGAAAATTGC	64
spoVFA-R2	TTCAGTGATACGTGCCAGATG	65
spoVGpro-F	CGGAAGGATACTACATCCTGGCGTTAGTCGAGATCGAAGTTA	66
spoVGpro-R	TATTTCCCTCCTTTCGCCCTATATAAAAGCATTAGTGTATC	67
Cm-F	GGATAGACTCCACCAGAAGAGCATCATCGGAATAGTTACCC	68
Cm-R	CCAGGATGTAGTATCCTCCGCGGCGTAGAGGATCTGGAGC	69
pckAFW	TGCTTCCTCCTGCACAAGGC	70
pckA/EmR	GCACTGATTGGTGTATCATGAAACCTCCTTATCGT	71
pckA/EmF	GCGTTTCTACAAACTCTGCATACCGATGCCATCGCCCCA	72
pckARV	GGGCAGGCAGCTTCATTGT	73
emf2	GATACACCAATCAGTGC	74
emr	CAAGAGTTGTAGAACGC	75
pckAFW2	CTCCCGAAAGACCTTGTAT	76
pckARV2	GAGCGGCAGGATTGCGGCG	77

## 【0085】

## (実施例2) DPA生産性評価

実施例1で構築したMGB874T\_PspoVG-spoVFA B株と、MGB874T\_PspoVG-spoVFA B\_pckA株を、5mLの合成培地(5.0質量%グルコース、0.6質量%塩化アンモニウム、0.15質量%リン酸水素2カリウム、0.035質量%硫酸マグネシウム7水和物、0.005質量%硫酸マンガン5水和物、50mM MOPS(モノホリノプロパンスルホン酸)緩衝剤(pH7.0)、その他微量金属)で30において一晩振盪培養を行い、得られた培養液を、合成培地(5.0質量%グルコース、0.6質量%塩化アンモニウム、0.15質量%リン酸水素2カリウム、0.035質量%硫酸マグネシウム7水和物、0.005質量%硫酸マンガン5水和物、50mM MOPS(モノホリノプロパンスルホン酸)緩衝剤(pH7.0)、その他微量金属、4.0質量%炭酸カルシウム)30mLに接種し、37、200rpmで2日間、振盪培養を行った。

培養終了後、下記に示す分析条件にてDPA生産量を測定し、MGB874T\_PspoVG-spoVFA B株の生産量を100%とした場合の相対値を求めた。

ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ遺伝子を欠失した枯草菌変異株MGB874T\_PspoVG-spoVFA B\_pckA株は、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ遺伝子が欠失前の株であるMGB874T\_PspoVG-spoVFA B株と比較して、DPA生産量120%まで増加した(表4)。

## 【0086】

10

20

30

40

【表4】

菌株名	DPA相対生産量 (%) (培養2日目)
MGB874T_PspoVG-spoVFAB	100
MGB874T_PspoVG-spoVFAB_Δ p c k A	120

## 【0087】

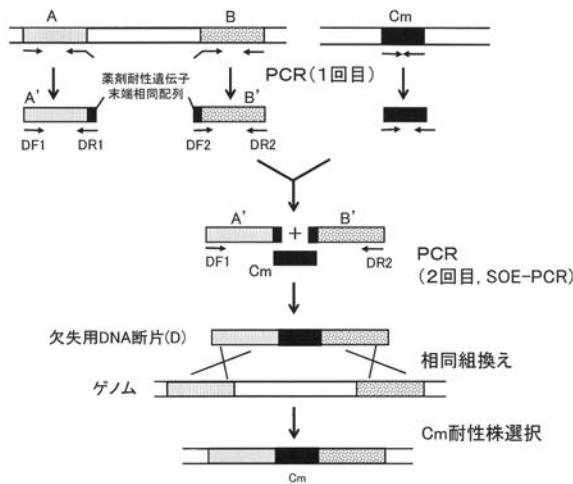
10

## D P A の定量

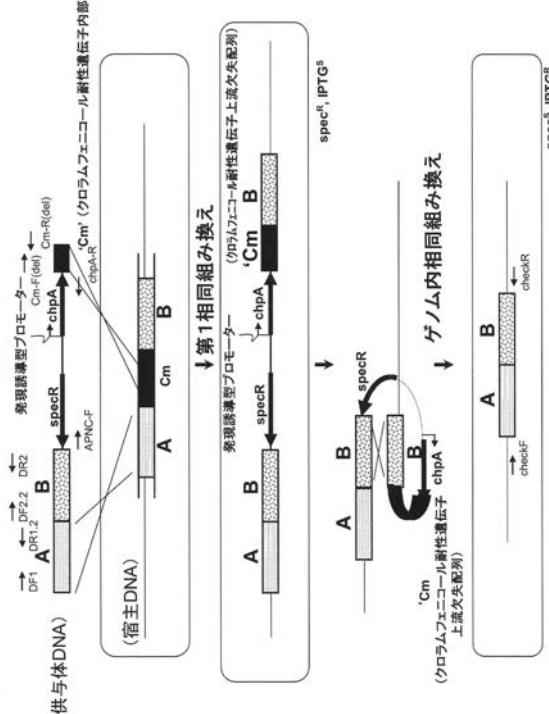
培養終了後の培養液試料を、室温にて 14,800 r p m で 30 分間の遠心分離（日立工機、himac C F 15 R X）に供し、得られた遠心分離後の試料上清中に含まれる D P A について、H P L C 法にて定量を行った。H P L C 装置は、送液ポンプ（島津、L C - 9 A）、オートサンプラー（日立計測機器、A S - 2000）、カラムオーブン（島津、C T O - 6 A）、U V 検出計（島津、S P D - 10 A）、脱ガス装置（G L サイエンス、D G 660 B）及びクロマトデータ解析装置（日立計測機器、D - 2500）を接続したもの用いた。分析カラムは、High Performance Carbohydrate Column 60 ( ) 4 μm 4.6 × 250 mm H P L C Column (Aminopropylmethylsilyl bonded amorphous silica) (Waters) を使用した。溶離液としては、20 mM EDTA を含む濃リン酸で pH 3.4 に合わせた水溶液とアセトニトリル溶液とを 1 : 1 に混合した溶液を用いた。測定条件は、検出波長を 270 nm とし、流速を 1 mL / 分とした。H P L C 分析に供するサンプルは、不溶物を除くため、MULTI SCREEN MN HV 45 (MILLIPOR E 製、0.45 μm デュラポア膜) にてフィルターろ過により前処理した。濃度検定は、2,6-Pyridinedicarboxylic acid : D P A , 99% (SIGMA - ALDRICH) を用いて作成した検量線に基づいて行った。

20

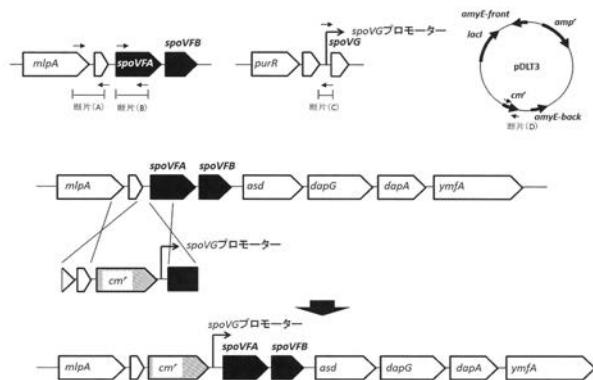
【図1】



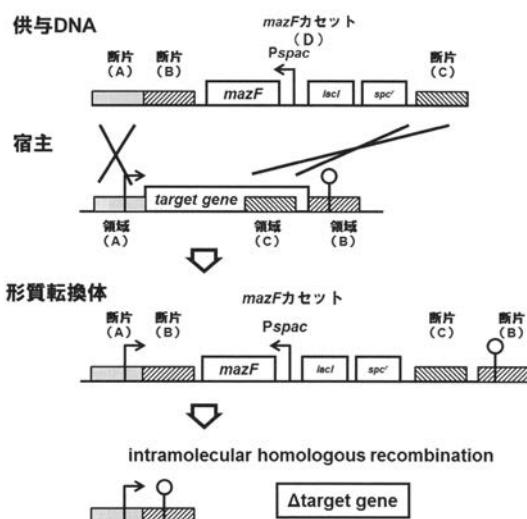
【図2】



【図3】



【図4】



【配列表】

2017195860000001.app

---

フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
C 1 2 N 9/00 (2006.01) C 1 2 N 9/00

(74)代理人 100111028  
弁理士 山本 博人  
(72)発明者 劉 生浩  
栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会社研究所内  
(72)発明者 増田 健太  
栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会社研究所内  
(72)発明者 影山 泰  
栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会社研究所内  
(72)発明者 清水 浩  
大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内  
(72)発明者 戸谷 吉博  
大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内  
F ターム(参考) 4B050 CC04 DD02 LL04 LL10  
4B064 AD09 AD20 AD27 AE01 CA02 CA19 CA21 CC24 DA16 DA19  
DA20  
4B065 AA15X AA15Y AB01 AC14 BA01 CA11 CA16 CA50 CA54 CA57  
CA60  
4H045 AA10 AA20 BA10 CA11 DA89 EA15 EA35 EA36 EA60 FA74