

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2015 年 4 月 9 日(09.04.2015)



(10) 国際公開番号
WO 2015/050184 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 1/21 (2006.01) *C12P 19/04* (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/076357
- (22) 国際出願日: 2014 年 10 月 2 日(02.10.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2013-207003 2013 年 10 月 2 日(02.10.2013) JP
特願 2013-259620 2013 年 12 月 16 日(16.12.2013) JP
特願 2013-259621 2013 年 12 月 16 日(16.12.2013) JP
特願 2014-039250 2014 年 2 月 28 日(28.02.2014) JP
- (71) 出願人: 味の素株式会社(AJINOMOTO CO., INC.)
[JP/JP]; 〒1048315 東京都中央区京橋一丁目 1 5
番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 山崎 俊介(YAMAZAKI, Shunsuke); 〒
2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1
味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 清水 朋子
(SHIMIZU, Tomoko); 〒2108681 神奈川県川崎市川
崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社内 Kanagawa
(JP). 森 健一(MORI, Kenichi); 〒2108681 神奈川県
川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社内
Kanagawa (JP). 外内 尚人(TONOUCHI, Naoto); 〒
2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1
味の素株式会社内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 川口 嘉之, 外(KAWAGUCHI, Yoshiyuki
et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋 3 丁目 4

番 1 0 号 アクロポリス 2 1 ビル 6 階 Tokyo
(JP).

- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN,
IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,
LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH,
PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,
MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユー
ラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨー
ロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

(54) Title: HEPAROSAN-PRODUCING BACTERIUM AND HEPAROSAN MANUFACTURING METHOD

(54) 発明の名称: ヘパロサン生産細菌及びヘパロサンの製造法

(57) Abstract: Provided is a heparosan manufacturing method. Heparosan is manufactured by culturing in a medium an Escherichia sp. bacterium with heparosan-producing ability, the bacterium having been modified so that expression of one or more genes selected from a group consisting of rbsR, rbsK, rbsB, hsrA, glgB, glgX, micF, rcsD, rcsB, ybiX, ybiI, ybiJ, ybiC, ybiB, rfaH, nusG, pcoR, pcoS, pcoE, yhcN, yhcO, aaeB, aaeA, aaeX, g1455, alpA, g1453, yrbA, mlaB, mlaC, mlaD, mlaE, mlaF, yrbG, norW, ybjI, ybjJ, ybjK, rybB, yjiY, yjtD, thrL, thrA, thrB, fruA, psuK, ytfT, yjff, fbp, yagU, paoA, paoB, gsiC, gsiD, yliE, irp2, irp1, bhsA, ycfS, lepB, rnc, era, dapA, gcvR, bcp, hyfA, rpoE, nadB, yfiC, srmB, g1414, g1413, nuoE, nuoF, nuoG, glmZ, hemY, hemX, hemD, rlmL, artQ, artM, artJ, rlmC, ybjO, yejO, yejM, yejL, rpoS, ygbN, ygbM, ygbL, g3798, g3797, g3796, g3795, g3794, g3793, g3792, ryjA, soxR, soxS, yjcC, yjcB, efeU, and efeO genes is increased, and collecting the heparosan from said medium.

(57) 要 約 : ヘ パ ロ サ ン の 製 造 法 を 提 供 す
る。rbsR、rbsK、rbsB、hsrA、glgB、glgX、micF、rcsD、rcsB、ybiX、ybiI、ybiJ、ybiC、ybiB、rfaH、nusG、pcoR、
pcoS、pcoE、yhcN、yhcO、aaeB、aaeA、aaeX、g1455、alpA、g1453、yrbA、mlaB、mlaC、mlaD、mlaE、mlaF、
yrbG、norW、ybjI、ybjJ、ybjK、rybB、yjiY、yjtD、thrL、thrA、thrB、fruA、psuK、ytfT、yjff、fbp、yagU、paoA、
paoB、gsiC、gsiD、yliE、irp2、irp1、bhsA、ycfS、lepB、rnc、era、dapA、gcvR、bcp、hyfA、rpoE、nadB、yfiC、
srmB、g1414、g1413、nuoE、nuoF、nuoG、glmZ、hemY、hemX、hemD、rlmL、artQ、artM、artJ、rlmC、ybjO、
yejO、yejM、yejL、rpoS、ygbN、ygbM、ygbL、g3798、g3797、g3796、g3795、g3794、g3793、g3792、ryjA、soxR、
soxS、yjcC、yjcB、efeU、およびefeO遺伝子からなる群より選択される1またはそれ以上の遺伝子の発現
が増大するように改変されたヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌を培地で培養し、該培地より
ヘパロサンを回収することにより、ヘパロサンを製造する。

WO 2015/050184 A1

明 細 書

発明の名称：ヘパロサン生産細菌及びヘパロサンの製造法

技術分野

[0001] 本発明は、ヘパロサン生産細菌及びヘパロサンの製造法に関する。

背景技術

[0002] ヘパロサン（N-アセチルヘパロサンともいう）は、グルクロン酸（GlcUA）残基とN-アセチル-D-グルコサミン（GlcNAc）残基からなる二糖の繰り返し構造[→4)-β-GlcUA-(1→4)-α-GlcNAc-(1→]より構成される多糖である。

[0003] 自然界において、ヘパロサンは、エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）K5株およびパスツレラ・ムルトシダ（*Pasteurella multocida*）タイプD株により莢膜多糖として産生される（非特許文献1）。これらのヘパロサン生産細菌は、哺乳動物に対して尿路感染症や萎縮性鼻炎等の病原性を示す。

[0004] エシェリヒア・コリK5株において、ヘパロサンの生合成には、ヘパロサン合成酵素であるグルコシルトランスフェラーゼ2種、およびヘパロサン排出担体6種が必要である。すなわち、まず、グルコシルトランスフェラーゼ（KfiAおよびKfiC）によってGlcNAcおよびGlcUAが糖鎖非還元末端へ交互に付加され、ヘパロサン鎖が伸長される（非特許文献2）。その後、ヘパロサン鎖は、ヘパロサン排出担体（KpsC、KpsD、KpsE、KpsM、KpsS、およびKpsT）を介して細胞表面上に輸送される（非特許文献3）。ヘパロサン鎖は、その還元末端での脂質置換を介して、細胞表面上でエシェリヒア・コリの外膜中のホスファチジン酸分子に固定されると考えられる（非特許文献4）。

[0005] エシェリヒア・コリK5株では、ヘパロサン合成酵素遺伝子およびヘパロサン排出担体遺伝子は染色体上でクラスターを形成している。クラスターは、Region1～3に区分され、クラスターの中央に位置するRegion2が、ヘパロサン合成酵素を含む4つのタンパク質（KfiA、KfiB、KfiC、KfiD）をコードする。

[0006] また、パスツレラ・ムルトシダ タイプD株は、ヘパロサン合成酵素（グル

コシルトランスフェラーゼ)としてPmHS1を有する(非特許文献5)。PmHS1はエシェリヒア・コリK5株由来のKfiAおよびKfiCの両方と相同性のある活性ドメインを有しており、UDP-グルクロン酸およびUDP-N-アセチルグルコサミンの両方を基質として重合反応を触媒する。パスツレラ・ムルトシダ タイプD株のヘパロサン排出担体は未だ明らかにされていない。

[0007] ヘパリン (heparin) は抗凝固薬の一つであり、血栓塞栓症 (thromboembolism) や播種性血管内凝固症候群 (disseminated intravascular coagulation ; DIC) の治療、人工透析や体外循環での血液凝固防止などに用いられる。ヘパロサンはヘパリンの糖鎖骨格であり、脱アセチル化、異性化、硫酸化、分子量調整等の工程を経ることによってヘパリン類似多糖類へと変換できる (非特許文献6、7)。

[0008] ヘパリンは、抗凝固因子であるアンチトロンビンIIIの活性化を通じて、抗凝固作用を示す。アンチトロンビンIIIは、トロンビン、第Xa因子 (第X因子の活性型)、およびその他のセリンプロテアーゼを、その活性セリン部位と結合することで阻害する。なお、トロンビンは血液凝固因子であり、第Xa因子はトロンビンの成熟に関与する因子である。ヘパリンは、このアンチトロンビンIIIと結合し、その構造を変化させて阻害作用を活性化する。トロンビンは、ヘパリン-アンチトロンビンIII複合体に対して、第Xa因子よりも高い親和性を有する。

[0009] また、ヘパリンを酵素/化学処理および分画して得られる平均分子量4000-6000Daの低分子ヘパリンは、出血の副作用が少なく、近年使用頻度が増えている。低分子ヘパリンは、糖鎖が短いため、アンチトロンビンIIIとは結合できるが、トロンビンとはほとんど結合できない。ここで、ヘパリン-アンチトロンビンIII複合体によるトロンビンの阻害では、トロンビンがヘパリンに結合する必要があるのに対し、ヘパリン-アンチトロンビンIII複合体による第Xa因子の阻害では、第Xa因子がヘパリンに結合する必要はない。そのため、低分子ヘパリンは、トロンビンの作用をほとんど阻害しないのに対し、第Xa因子の作用は阻害できる。

- [0010] 現在、大部分のヘパリン製剤は、豚腸粘膜からの抽出品である。しかしながら、2008年に不純物混入を原因とする死亡事故が発生したことから、品質管理された非動物由来ヘパリンの製造開発が検討されてきた。
- [0011] 近年、実験室規模の研究により、エシェリヒア・コリK5株から得られるヘパロサンを、ヘパリンに類似する抗凝固多糖類に酵素的に変換することができることが示された（非特許文献6、7）。また、ヘパロサンは、ヘパリンの製造以外にも、様々な用途において用いることができる（特許文献1）。
- [0012] ヘパロサンの大規模生産検討はエシェリヒア・コリK5株を用いて行われており、7 L発酵槽にて15 g/Lのヘパロサンが生成されたとの報告がある（非特許文献8、特許文献2）。ヘパリン製造の原料としてヘパロサンを工業化規模で供給するためには、100,000 L 規模へのスケールアップが必要であるが、基質消費速度向上や発酵槽の酸素供給増加などの課題が挙げられている。
- [0013] さらに、ごく最近、非病原性エシェリヒア・コリBL21(DE3)株を宿主としたヘパロサン生産細菌が報告された（非特許文献9）。すなわち、エシェリヒア・コリK5株由来Region2を構成する4つのヘパロサン生合成遺伝子kfiA, kfiB, kfiC, kfiDを発現ベクターpETDuet-1に搭載しBL21株へ導入することにより、フラスコ培養にて334 mg/Lのヘパロサン生成が確認されている。
- [0014] ヘパロサン生産に必要な因子は明らかとなっているが、ヘパロサン生産細菌においてヘパロサン生産能を向上させる因子は知られていない。

先行技術文献

特許文献

- [0015] 特許文献1：WO 2009/014559
特許文献2：特表2013-503606

非特許文献

- [0016] 非特許文献1：Lindahl U. et al. (1998) J Biol Chem 273(39): 24979-24982
非特許文献2：Hodson N. et al. (2000) J Biol Chem 275(35): 27311-27315
非特許文献3：McNulty C. et al. (2006) Mol Microbiol 59(3): 907-22

非特許文献4 : Jann B, Jann K. (1990) Curr Top Microbiol Immunol 150: 19-42

非特許文献5 : Kane T.A. et al. (2006) J Biol Chem Nov 3; 281(44): 33192-33197

非特許文献6 : Lindahl U. et al. (2005) J Med Chem 48(2): 349-352

非特許文献7 : Zhang Z. et al. (2008) Journal of the American Chemical Society 130(39): 12998-13007

非特許文献8 : Wang Z. et al. (2010) Biotechnol Bioeng. 107(6): 964 ? 973

非特許文献9 : Zang C. et al. (2012) Metabolic Engineering 14(5): 521 ? 527

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0017] 本発明は、細菌のヘパロサン生産能を向上させる新規な技術を開発し、効率的なヘパロサンの製造法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0018] 本願発明者らは、鋭意検討の結果、ヘパロサン生産能を有する細菌において、表1～3に記載の遺伝子から選択される1またはそれ以上の遺伝子の発現を増大させることによって、ヘパロサン生産能を向上させることができることを見出し、本発明を完成させた。

[0019]

[表1]

表 1

遺伝子	遺伝子産物の機能
<i>rbsR</i>	DNA-binding transcriptional repressor of ribose metabolism
<i>rbsK</i>	enzyme; Degradation of small molecules: Carbon compounds
<i>rbsB</i>	D-ribose transporter subunit
<i>hsrA</i>	inner membrane protein, multidrug efflux pump
<i>glgB</i>	1,4- α -glucan branching enzyme
<i>glgX</i>	glycogen debranching enzyme
<i>micF</i>	Regulatory antisense sRNA affecting ompF expression; member of soxRS regulon
<i>rcsD</i>	phosphotransfer intermediate protein in two-component regulatory system with RcsBC
<i>rcsB</i>	DNA-binding response regulator in two-component regulatory system with RcsC and YojN
<i>ybiX</i>	conserved protein
<i>ybiI</i>	DksA-type zinc finger protein, function unknown
<i>ybiJ</i>	predicted protein
<i>ybiC</i>	predicted dehydrogenase
<i>ybiB</i>	predicted transferase/phosphorylase
<i>rfaH</i>	transcriptional antiterminator
<i>nusG</i>	transcription terminator

[0020]

[表2]

表 2

遺伝子	遺伝子産物の機能
<i>pcoE</i>	Probable copper-binding protein pcoE precursor
<i>pcoS</i>	Probable sensor protein pcoS
<i>pcoR</i>	Transcriptional regulatory protein pcoR
<i>yhcN</i>	conserved protein
<i>yhcO</i>	predicted barnase inhibitor
<i>aaeB</i>	p-hydroxybenzoic acid efflux system component
<i>aaeA</i>	p-hydroxybenzoic acid efflux system component
<i>aaeX</i>	membrane protein of efflux system
<i>gl455</i>	hypothetical protein
<i>alpA</i>	Predicted transcriptional regulator
<i>gl453</i>	Haemolysin expression modulating protein
<i>yrbA</i>	predicted DNA-binding transcriptional regulator, BOLA family
<i>m1aB</i>	ABC transporter maintaining OM lipid asymmetry, cytoplasmic STAS component
<i>m1aC</i>	ABC transporter maintaining OM lipid asymmetry, periplasmic binding protein
<i>m1aD</i>	ABC transporter maintaining OM lipid asymmetry, anchored periplasmic binding protein
<i>m1aE</i>	ABC transporter maintaining OM lipid asymmetry, inner membrane permease protein
<i>m1aF</i>	ABC transporter maintaining OM lipid asymmetry, ATP-binding protein
<i>yrbG</i>	predicted calcium/sodium:proton antiporter
<i>norW</i>	NADH:flavobredoxin oxidoreductase
<i>ybjI</i>	FMN and erythrose-4-P phosphatase
<i>ybjJ</i>	predicted transporter
<i>ybjK</i>	predicted DNA-binding transcriptional regulator
<i>rybB</i>	sRNA effector of ompC and ompW mRNA instability; requires Hfq
<i>thrB</i>	homoserine kinase
<i>thrA</i>	fused aspartokinase I and homoserine dehydrogenase I
<i>thrL</i>	thr operon leader peptide
<i>yjLD</i>	predicted rRNA methyltransferase
<i>yjjY</i>	predicted protein
<i>fruA</i>	fused fructose-specific PTS enzymes:IIIBcomponent/IIC components
<i>psuK</i>	pseudouridine kinase
<i>ytfT</i>	predicted sugar transporter subunit: membrane component of ABC superfamily
<i>yjff</i>	predicted sugar transporter subunit: membrane component of ABC superfamily
<i>fbp</i>	fructose-1,6-bisphosphatase I
<i>yagU</i>	inner membrane protein, DUF1440 family
<i>paoA</i>	PaoABC aldehyde oxidoreductase, 2Fe-2S subunit
<i>paoB</i>	PaoABC aldehyde oxidoreductase, FAD-containing subunit
<i>gsiC</i>	glutathione transporter, permease component, ABC superfamily
<i>gsiD</i>	glutathione transporter, permease component, ABC superfamily
<i>yliE</i>	predicted cyclic di-GMP phosphodiesterase, inner membrane protein
<i>irp2</i>	non-ribosomal peptide synthase
<i>irp1</i>	non-ribosomal peptide synthase
<i>bhsA</i>	biofilm, cell surface and signaling protein
<i>ycfS</i>	L,D-transpeptidase linking Lpp to murein

[0021]

[表3]

表 3

遺伝子	遺伝子産物の機能
<i>lepB</i>	leader peptidase (signal peptidase I)
<i>rnc</i>	RNase III
<i>era</i>	factor; Global regulatory functions
<i>dapA</i>	dihydrodipicolinate synthase
<i>gcvR</i>	DNA-binding transcriptional repressor, regulatory protein accessory to GcvA
<i>bcp</i>	peroxiredoxin; thiol peroxidase, thioredoxin-dependent
<i>hyfA</i>	hydrogenase 4, 4Fe-4S subunit
<i>rpoE</i>	RNA polymerase, sigma 24 (sigma E) factor
<i>nadB</i>	quinolinate synthase, L-aspartate oxidase (B protein) subunit
<i>yfiC</i>	tRNA ¹ (Val) (adenine(37)-N6)-methyltransferase
<i>srmB</i>	ATP-dependent RNA helicase
<i>glI414</i>	Putative transposase
<i>glI413</i>	putative transposase
<i>nuoE</i>	NADH:ubiquinone oxidoreductase, chain E
<i>nuoF</i>	NADH:ubiquinone oxidoreductase, chain F
<i>nuoG</i>	NADH:ubiquinone oxidoreductase, chain G
<i>glmZ</i>	sRNA antisense activator of glmS mRNA, Hfq-dependent
<i>hemY</i>	putative protoheme IX synthesis protein
<i>hemX</i>	putative uroporphyrinogen III methyltransferase
<i>hcmD</i>	uroporphyrinogen III synthase
<i>rmlL</i>	fused 23S rRNA m(2)G2445 and m(7)G2069 methyltransferase, SAM-dependent
<i>artQ</i>	arginine transporter subunit
<i>artM</i>	arginine transporter subunit
<i>artJ</i>	arginine binding protein, periplasmic
<i>rmlC</i>	23S rRNA m(5)U747 methyltransferase, SAM-dependent
<i>ybjO</i>	inner membrane protein, DUF2593 family
<i>yejO</i>	autotransporter outer membrane homology
<i>yejM</i>	putative hydrolase, inner membrane
<i>yejL</i>	conserved protein, UPF0352 family
<i>rpoS</i>	RNA polymerase, sigma S (sigma 38) factor
<i>ygbN</i>	putative transporter
<i>ygbM</i>	hypothetical protein
<i>ygbL</i>	putative class II aldolase
<i>g3798</i>	SOS-response transcriptional repressors (RecA-mediated autopeptidases)
<i>g3797</i>	hypothetical protein
<i>g3796</i>	hypothetical protein
<i>g3795</i>	hypothetical protein
<i>g3794</i>	Superinfection exclusion protein B
<i>g3793</i>	Restriction inhibitor protein ral (Antirestriction protein)
<i>g3792</i>	hypothetical protein
<i>ryjA</i>	novel sRNA, function unknown
<i>soxR</i>	DNA-binding transcriptional dual regulator, Fe-S center for redox-sensing
<i>soxS</i>	DNA-binding transcriptional dual regulator
<i>yjcC</i>	putative membrane-anchored cyclic-di-GMP phosphodiesterase
<i>yjcB</i>	hypothetical protein
<i>efeU</i>	ferrous iron permease (pseudogene)
<i>efeO</i>	inactive ferrous ion transporter EfeUOB

[0022] すなわち、本発明は以下の通り例示できる。

[1]

ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌であって、

rpoE、rbsR、rbsK、rbsB、hsrA、glgB、glgX、micF、rcsD、rcsB、ybiX、ybiI、ybiJ、ybiC、ybiB、rfaH、nusG、pcoR、pcoS、pcoE、yhcN、yhcO、aaeB、aaeA、aaeX、g1455、alpA、g1453、yrbA、mlaB、mlaC、mlaD、mlaE、mlaF、yrbG、norW、ybjI、ybjJ、ybjK、rybB、yjjY、yjtD、thrL、thrA、thrB、fruA、psuK、ytfT、yjfF、fbp、yagU、paoA、paoB、gsiC、gsiD、yliE、irp2、irp1、bhsA、ycfS、lepB、rnc、era、dapA、gcvR、bcp、hyfA、nadB、yfiC、srmB、g1414、g1413、nuoE、nuoF、nuoG、glmZ、hemY、hemX、hemD、rlmL、artQ、artM、artJ、rlmC、ybjO、yejO、yejM、yejL、rpoS、ygbN、ygbM、ygbL、g3798、g3797、g3796、g3795、g3794、g3793、g3792、ryjA、soxR、soxS、yjcC、yjcB、efeU、およびefeO遺伝子からなる群より選択される1またはそれ以上の遺伝子の発現が増大するように改変されていることを特徴とする、細菌。

[2]

少なくともrpoE遺伝子の発現が増大するように改変されている、前記細菌。

[3]

少なくともrfaH遺伝子の発現が増大するように改変されている、前記細菌。

[4]

さらに、rbsR、rbsK、rbsB、hsrA、glgB、glgX、micF、rcsD、rcsB、ybiX、ybiI、ybiJ、ybiC、ybiB、nusG、pcoR、pcoS、pcoE、yhcN、yhcO、aaeB、aaeA、aaeX、g1455、alpA、g1453、yrbA、mlaB、mlaC、mlaD、mlaE、mlaF、yrbG、norW、ybjI、ybjJ、ybjK、rybB、yjjY、yjtD、thrL、thrA、thrB、fruA、psuK、ytfT、yjfF、fbp、yagU、paoA、paoB、gsiC、gsiD、yliE、irp2、irp1、bhsA、およびycfS遺伝子からなる群より選択される1またはそれ以上の遺伝子の発現が増大するように改変されている、前記細菌。

[5]

前記遺伝子の発現が、該遺伝子のコピー数を高めること、及び／又は該遺

伝子の発現調節配列を改変することによって増大した、前記細菌。

[6]

エシェリヒア・コリである、前記細菌。

[7]

前記rbsB遺伝子が、配列番号29の800～1690位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号29の800～1690位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記rbsK遺伝子が、配列番号29の1816～2745位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号29の1816～2745位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記rbsR遺伝子が、配列番号29の2749～3741位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号29の2749～3741位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記hsrA遺伝子が、配列番号29の3707～5134位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号29の3707～5134位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記glgB遺伝子が、配列番号34の989～3175位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号34の989～3175位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大さ

せる性質を有するDNAであり；

前記glgX遺伝子が、配列番号34の3172～5145位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号34の3172～5145位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記rcsB遺伝子が、配列番号43の3312～3962位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号43の3312～3962位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記rcsD遺伝子が、配列番号43の623～3295位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号43の623～3295位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記micF遺伝子が、配列番号43の219～311位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号43の219～311位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記ybiX遺伝子が、配列番号37の718～1395位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号37の718～1395位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記ybiI遺伝子が、配列番号37の1469～1735位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号37の1469～1735位に示す塩基配列と90%以上の

同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記ybiJ遺伝子が、配列番号37の2000～2260位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号37の2000～2260位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記ybiC遺伝子が、配列番号37の2488～3574位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号37の2488～3574位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記ybiB遺伝子が、配列番号37の3715～4677位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号37の3715～4677位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記rfaH遺伝子が、配列番号46に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号46に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記nusG遺伝子が、配列番号48に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号48に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記pcoR遺伝子が、配列番号50の128～808位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号50の128～808位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記pcoS遺伝子が、配列番号50の805～2205位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号50の805～2205位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記pcoE遺伝子が、配列番号50の2423～2857位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号50の2423～2857位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記yhcN遺伝子が、配列番号54の63～326位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号54の63～326位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記yhc0遺伝子が、配列番号54の382～654位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号54の382～654位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記aaeB遺伝子が、配列番号54の746～2713位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号54の746～2713位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能

を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記aaeA遺伝子が、配列番号54の2719～3651位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号54の2719～3651位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記aaeX遺伝子が、配列番号54の3659～3931位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号54の3659～3931位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記g1455遺伝子が、配列番号60の568～1140位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号60の568～1140位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記alpA遺伝子が、配列番号60の1226～1486位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号60の1226～1486位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記g1453遺伝子が、配列番号60の2389～2529位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号60の2389～2529位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記yrbA遺伝子が、配列番号64の977～1246位に示す塩基配列の相補配列

を含むDNA、または、配列番号64の977～1246位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記mlaB遺伝子が、配列番号64の1391～1780位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号64の1391～1780位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記mlaC遺伝子が、配列番号64の1684～2319位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号64の1684～2319位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記mlaD遺伝子が、配列番号64の2338～2889位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号64の2338～2889位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記mlaE遺伝子が、配列番号64の2894～3676位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号64の2894～3676位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記mlaF遺伝子が、配列番号64の3684～4493位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号64の3684～4493位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌の

ヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記yrbG遺伝子が、配列番号64の4703～5680位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号64の4703～5680位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記norW遺伝子が、配列番号72の1201～2334位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号72の1201～2334位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記ybjI遺伝子が、配列番号74の117～932位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号74の117～932位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記ybjJ遺伝子が、配列番号74の932～2140位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号74の932～2140位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記ybjK遺伝子が、配列番号74の2224～2760位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号74の2224～2760位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記rybB遺伝子が、配列番号74の2777～2855位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号74の2777～2855位に示す塩基配列の相

補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記yjjY遺伝子が、配列番号78の124～264位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号78の124～264位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記yjtD遺伝子が、配列番号78の664～1350位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号78の664～1350位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記thrL遺伝子が、配列番号78の1564～1629位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号78の1564～1629位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記thrA遺伝子が、配列番号78の1711～4173位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号78の1711～4173位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記thrB遺伝子が、配列番号78の4175～5107位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号78の4175～5107位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記fruA遺伝子が、配列番号84の897～2588位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号84の897～2588位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記psuK遺伝子が、配列番号84の3165～3953位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号84の3165～3953位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記ytfT遺伝子が、配列番号87の252～1277位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号87の252～1277位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記yjfF遺伝子が、配列番号87の1264～2259位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号87の1264～2259位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記fbp遺伝子が、配列番号87の2292～3290位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号87の2292～3290位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記yagU遺伝子が、配列番号91の117～731位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号91の117～731位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能

を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記paoA遺伝子が、配列番号91の1149～1838位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号91の1149～1838位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記paoB遺伝子が、配列番号91の1835～2791位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号91の1835～2791位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記gsiC遺伝子が、配列番号95の264～1184位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号95の264～1184位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記gsiD遺伝子が、配列番号95の1187～2098位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号95の1187～2098位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記yliE遺伝子が、配列番号95の2276～4624位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号95の2276～4624位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記irp2遺伝子が、配列番号100に示す塩基配列を含むDNA、または

、配列番号 100 に示す塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有する DNA であり；

前記 *irp1* 遺伝子が、配列番号 102 に示す塩基配列を含む DNA、または、配列番号 102 に示す塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有する DNA であり；

前記 *bhsA* 遺伝子が、配列番号 104 の 440～697 位に示す塩基配列を含む DNA、または、配列番号 104 の 440～697 位に示す塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有する DNA であり；

前記 *ycfS* 遺伝子が、配列番号 104 の 779～1741 位に示す塩基配列の相補配列を含む DNA、または、配列番号 104 の 779～1741 位に示す塩基配列の相補配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有する DNA であり；

前記 *lepB* 遺伝子が、配列番号 107 の 1344～2318 位に示す塩基配列を含む DNA、または、配列番号 107 の 1344～2318 位に示す塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有する DNA であり；

前記 *rnc* 遺伝子が、配列番号 107 の 2590～3270 位に示す塩基配列を含む DNA、または、配列番号 107 の 2590～3270 位に示す塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を

増大させる性質を有するDNAであり；

前記era遺伝子が、配列番号107の3267～4172位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号107の3267～4172位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記dapA遺伝子が、配列番号111の858～1736位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号111の858～1736位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記gcvR遺伝子が、配列番号111の1882～2454位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号111の1882～2454位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記bcp遺伝子が、配列番号111の2454～2924位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号111の2454～2924位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記hyfA遺伝子が、配列番号111の3177～3794位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号111の3177～3794位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記rpoE遺伝子が、配列番号116の355～930位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号116の355～930位に示す塩基配列の相

補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記nadB遺伝子が、配列番号116の1338～2960位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号116の1338～2960位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記yfiC遺伝子が、配列番号116の2945～3682位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号116の2945～3682位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記srmB遺伝子が、配列番号116の3814～5148位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号116の3814～5148位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記g1414遺伝子が、配列番号121の28～699位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号121の28～699位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記g1413遺伝子が、配列番号121の831～1157位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号121の831～1157位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記nuoE遺伝子が、配列番号124の796～1296位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号124の796～1296位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記nuoF遺伝子が、配列番号124の1293～2630位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号124の1293～2630位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記nuoG遺伝子が、配列番号124の2683～5409位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号124の2683～5409位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記glmZ遺伝子が、配列番号128の357～563位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号128の357～563位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記hemY遺伝子が、配列番号128の611～1807位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号128の611～1807位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記hemX遺伝子が、配列番号128の1810～2991位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号128の1810～2991位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシ

エリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記hemD遺伝子が、配列番号128の3013～3753位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号128の3013～3753位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシエリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記rlmL遺伝子が、配列番号132の571～2679位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号132の571～2679位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシエリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記artQ遺伝子が、配列番号134の386～1102位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号134の386～1102位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシエリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記artM遺伝子が、配列番号134の1102～1770位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号134の1102～1770位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシエリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記artJ遺伝子が、配列番号134の2061～2792位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号134の2061～2792位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシエリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記rlmC遺伝子が、配列番号134の2991～4118位に示す塩基配列の相補

配列を含むDNA、または、配列番号134の2991～4118位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記ybj0遺伝子が、配列番号134の4159～4647位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号134の4159～4647位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記yej0遺伝子が、配列番号140の216～2807位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号140の216～2807位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記yejM遺伝子が、配列番号140の3061～4821位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号140の3061～4821位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記yejL遺伝子が、配列番号140の4841～5068位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号140の4841～5068位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記rpoS遺伝子が、配列番号144の318～1310位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号144の318～1310位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増

大させる性質を有するDNAであり；

前記ygbN遺伝子が、配列番号144の1404～2768位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号144の1404～2768位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記ygbM遺伝子が、配列番号144の2857～3633位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号144の2857～3633位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記ygbL遺伝子が、配列番号144の3638～4276位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号144の3638～4276位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記g3798遺伝子が、配列番号149の615～1268位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号149の615～1268位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記g3797遺伝子が、配列番号149の1368～2219位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号149の1368～2219位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記g3796遺伝子が、配列番号149の2257～2748位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号149の2257～2748位に示す塩基配列と90%以

上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記g3795遺伝子が、配列番号149の3021～3203位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号149の3021～3203位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記g3794遺伝子が、配列番号149の3470～4051位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号149の3470～4051位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記g3793遺伝子が、配列番号149の4280～4480位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号149の4280～4480位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記g3792遺伝子が、配列番号149の4520～4717位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号149の4520～4717位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記ryjA遺伝子が、配列番号157の657～796位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号157の657～796位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記soxR遺伝子が、配列番号157の790～1254位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号157の790～1254位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記soxS遺伝子が、配列番号157の1340～1663位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号157の1340～1663位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記yjcC遺伝子が、配列番号157の1666～3252位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号157の1666～3252位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記yjcB遺伝子が、配列番号157の3682～3963位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号157の3682～3963位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記efeU遺伝子が、配列番号162の753～1583位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号162の753～1583位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記efe0遺伝子が、配列番号162の1641～2768位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号162の1641～2768位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエ

エリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAである、前記細菌。

[8]

前記細菌を培地で培養し、ヘパロサンを該培地中に生成蓄積すること、および該培地よりヘパロサンを採取すること、を含むヘパロサンの製造法。

[9]

前記細菌を培地で培養し、ヘパロサンを該培地中に生成蓄積すること、該ヘパロサンを化学的および／または酵素的に処理してヘパリンを生産すること、および該ヘパリンを回収すること、を含むヘパリンの製造法。

[0023] 表1～3に記載した各遺伝子の遺伝子産物の機能およびヘパロサン生産との関連について以下に述べる。

[0024] RbsR、RbsK、およびRbsBは、D-リボースの取り込みと利用に関与する因子である。RbsRは、リボース代謝のリプレッサーであり、リボースの異化反応に関与するタンパク質をコードするrbsオペロンの転写を負に制御する (Laikova ON et al. (2001) "Computational analysis of the transcriptional regulation of pentose utilization systems in the gamma subdivision of Proteobacteria." FEMS Microbiol Lett. 205(2):315-22)。RbsKは、リボキナーゼであり、D-リボースのリン酸化を触媒する (Bork P et al. (1993) "Convergent evolution of similar enzymatic function on different protein folds: the hexokinase, ribokinase, and galactokinase families of sugar kinases." Protein Sci. 2(1):31-40)。RbsBは、リボースABCトランスポーターを構成するサブユニットの1つであり、リボースABCトランスポーターはD-リボースの取り込みを行う (Iida A. et al. (1984) "Molecular cloning and characterization of genes required for ribose transport and utilization in Escherichia coli K-12." J Bacteriol. 158(2):674-82)。これらのタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。

[0025] HsrAは、メジャー・ファシリテーター・スーパーファミリー (MFS) の1種と推定される内膜タンパク質である (Pao SS et al. (1998) "Major facilit

ator superfamily.” *Microbiol Mol Biol Rev.* 62(1):1-34)。HsrAは、配列相同性よりプロトン駆動性の薬剤排出システムの機能を有すると推定されるが、その実際の機能は同定されていない。従って、このタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。

[0026] GlgBおよびGlgXは、それぞれ、グリコーゲンの生合成および分解に関する酵素である。GlgBは、グリコーゲン分枝酵素（1,4- α -グルカン分枝酵素）であり、グリコーゲン生合成過程において、 α -1,6-グリコシド結合の形成によりポリグルコース鎖に分岐を導入する（Boyer C and Preiss (1977) ”Biosynthesis of bacterial glycogen. Purification and properties of the *Escherichia coli* b alpha-1,4,-glucan: alpha-1,4-glucan 6-glycosyltransferase.” *J Biochemistry.* 16(16):3693-9)。GlgXは、グリコーゲン脱分枝酵素であり、3または4個のグルコース残基単位で α -1,6-グリコシド結合を加水分解し、グリコーゲンの分岐を解消する（Dauvillee D et al. (2005) ”Role of the *Escherichia coli* glgX gene in glycogen metabolism.” *J Bacteriol.* 187(4):1465-73)。これらのタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。

[0027] *micF*は、*OmpF*の発現抑制に関するアンチセンスRNAであり、特に浸透圧条件下で機能することが知られている（Ramani Nら(1994) ”*micF* antisense RNA has a major role in osmoregulation of *OmpF* in *Escherichia coli*.” *J. Bacteriol* 176:5005-5010)。このヌクレオチド鎖とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。

[0028] *RcsB*は、エシェリヒア (*Escherichia*) 属、サルモネラ (*Salmonella*) 属、クレブシエラ (*Klebsiella*) 属等に属する細菌に見られる転写制御因子であり、主に莢膜構成成分であるコラン酸 (Colanic acid) の生合成を制御していると考えられている（Majdalani Nら(2005) ”The *Rcs* phosphorelay: a complex signal transduction system.” *Annu. Rev. Microbiol.* 59:379-405)。また、*RcsB*は、シトロバクター・フロインディ (*Citrobacter freundii*) のVi多糖発現（Houng HSら (1992) ”Expression of Vi antigen in *Escherichia*

coli K-12: characterization of ViaB from *Citrobacter freundii* and identity of ViaA with RcsB” J. Bacteriol 174:5910-5915) やクレブシエラ属細菌のK2莢膜の発現 (Rochaporn Wら (1992) ”Involvement of rcsB in *Klebsiella* K2 Capsule Synthesis in *Escherichia coli* K-12” J. Bacteriol 174:1063-1067) に関与するとの報告がある。また、RcsBの過剰発現はK30莢膜多糖の生産を増大させることが知られているが、RcsBは、K30莢膜多糖の重合化酵素をコードするcspクラスターの転写には関与せず、前駆体であるUDP-グルコースの生合成酵素をコードするgalF遺伝子の発現を正に制御するとの報告がある (Andrea Rahnら (2003) ”Transcriptional organization and regulation of *The Escherichia coli*” Mol. Microbiol. 47:1045-1060)。一方、RcsBの過剰発現は、K5莢膜多糖 (ヘパロサン) やK1莢膜多糖の生産を増大させないと報告されている (Wendy J. Keenleysideら (1993) ”Coexpression of Colanic Acid and Serotype-Specific Capsular Polysaccharides in *Escherichia coli* Strains with Group II K Antigens” J. Bacteriol 175:6725-6730)。RcsDは、ヒスチジンキナーゼを有するセンサー蛋白質であり、外部からの刺激に応答してリン酸基をRcsBに伝達することが知られている。

[0029] YbiX、YbiI、YbiJ、YbiC、およびYbiBは機能未知の因子である。従って、これらのタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。

[0030] RfaHは、*Escherichia coli* および *Salmonella typhimurium* においてリポ多糖の生合成、 α -ヘモリシンの分泌、およびF因子の産生に必要な転写因子である (Leeds JA and Welch RA (1996) ”RfaH enhances elongation of *Escherichia coli* hlyCABD mRNA.” J Bacteriol. 178(7):1850-7.)。また、*Escherichia coli* K5株においては、K5莢膜形成にRfaHが必要であること (Stevens MP et al. (1994) ”Regulation of *Escherichia coli* K5 capsular polysaccharide expression: evidence for involvement of RfaH in the expression of group II capsules” FEMS Microbiol Lett. 124(1):93-98.)、および、RfaHは、Region3 (kpsM, kpsT) のプロモーター領域に結合し、R

egion3だけでなく下流のRegion2 (kfiA, kfiB, kfiC, kfiD) の転写を正に制御することが知られている (Xue P. et al. (2009) "Regulation of expression of the region 3 promoter of the Escherichia coli K5 capsule gene cluster involves H-NS, SlyA, and a large 5' untranslated region." J Bacteriol. 191(6):1838-1846.)。しかしながら、エシェリヒア・コリK5株や他のヘパロサン生産細菌において、rfaH遺伝子の発現増強によるヘパロサン生産量への影響は調べられていなかった。

[0031] NusGは転写因子であり、RNAポリメラーゼと相互作用することで転写を制御していると考えられている (Li J. et al. (1992) J Biol Chem 267(9): 6012-6019)。また、NusGは、バクテロイデス・フラジリス (*Bacteroides fragilis*) の莢膜生合成に関与しているとの報告がある (Livanis M. et al. (2009) J Bacteriol 191(23): 7288-7295)。しかし、いずれもこれまでにヘパロサン生合成との関与については報告がない。なお、NusGはRfaHのホモログであり、NusGはRfaHと共通のドメインを持つとされる (Bailey M. et al. (1996) Mol Microbiol 22(4): 7729-737)。しかしながら、エシェリヒア・コリK-12株、K5株、B株のいずれにおいても、NusGとRfaH間でのアミノ酸配列の相同性は20%程度であり、両者が高い相同性を有するとは言えない。

[0032] PcoR、PcoS、およびPcoEは、銅耐性に関与する因子である。PcoRおよびPcoSは、それぞれ、pcoオペロンのアクチベーターおよび環境刺激に応答する二成分制御系のセンサータンパク質に相同性が高い (Cooksey D.A. (2006) "Copper uptake and resistance in bacteria." Mol Microbiol. 7(1):1-5)。PcoEは、銅結合タンパク質である。これらのタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。

[0033] YhcNは、過酸化水素ストレスに対する菌体応答に関与する因子である。yhcN遺伝子の欠損株においては、過酸化水素への感受性が向上し、バイオフィルム形成量が増加する (Lee J. et al. (2010) "Identification of stress-related proteins in Escherichia coli using the pollutant cis-dichloroethylene." J Appl Microbiol. Jun;108(6):2088-102.)。このタンパク質とヘ

パロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。

[0034] Yhc0は、*Bacillus amyloliquefaciens*由来の有毒なRNaseであるバルナーゼの阻害因子と相同性がある。しかしながら、エシェリヒア (*Escherichia*) 属細菌はバルナーゼファミリーのRNaseを有しておらず、Yhc0の機能は明らかではない。従って、このタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。

[0035] AaeBおよびAaeAは、4-ヒドロキシ安息香酸の排出担体のサブユニットである。AaeXも排出担体と推定されるが、実際の機能は未知である (Van Dyk T. K. et al. (2004) "Characterization of the *Escherichia coli* AaeAB efflux pump: a metabolic relief valve?" *J. Bacteriol.* 186:7196-7204)。これらのタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。

[0036] g1455およびg1453遺伝子は、*Escherichia coli* K5株のみに見出された遺伝子であり、これらの遺伝子にコードされるタンパク質の機能は未知である。従って、これらのタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。

[0037] AlpAは、プロファージインテグラーゼをコードするintA遺伝子の発現調節因子であり、intAの発現増加を介してLonプロテアーゼの欠損を相補する働きを有する (Trempy J.E. et al. (1994) "Alp suppression of Lon: dependence on the slpA gene." *J Bacteriol.* 176(7):2061-7)。AlpAは、バイオフィルム形成や莢膜生成と関連がある可能性はあるものの (Herzberg M. et al. (2006) "YdgG (TqsA) controls biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 through autoinducer 2 transport." *J Bacteriol.* 188(2):587-98)、AlpAとヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。

[0038] YrbA (別名IbaG) は、DNA結合型転写因子と推定される因子であり、酸性ストレス条件下で発現量が増加する (Guinote I.B. et al. (2012) "Characterization of the BofA homolog IbaG: a new gene involved in acid resistance." *J Microbiol Biotechnol.* 22(4):484-93.)。このタンパク質とヘパロ

サン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。

[0039] MlaB、MlaC、MlaD、MlaE、およびMlaFは、リン脂質ABCトランスポーターの構成因子であり、リン脂質の輸送および脂質非対称性の維持に関与する (Malinverni J.C. and Silhavy T.J. (2009) "An ABC transport system that maintains lipid asymmetry in the gram-negative outer membrane." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(19):8009-14.). これらのタンパク質のヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。

[0040] YrbGは、5回膜貫通型の内膜タンパク質であり、配列相同性からNa⁺/Ca²⁺交換輸送体と推定されている。しかしながら、YrbGの菌体内Ca²⁺レベル調節能は確認されておらず、実際の機能は未知である (Naseem R. et al. (2008) "pH and monovalent cations regulate cytosolic free Ca(2+) in E. coli." *Biochim Biophys Acta*. 1778(6):1415-22)。従って、このタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見も全く存在しない。

[0041] NorWは、一酸化窒素 (NO) ストレスに応答して発現するNO還元酵素である (Gardner A.M. et al. (2003) "Role of NorR and sigma54 in the nitric oxide stress response." *J Biol Chem*. 278(12):10081-6.)。このタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。

[0042] YbjIは、ハロ酸脱ハロゲン化酵素様の加水分解酵素ファミリーに属するフラビンモノヌクレオチド (FMN) リン酸化酵素である (Kuznetsova E. et al. (2006) "Genome-wide analysis of substrate specificities of the Escherichia coli haloacid dehalogenase-like phosphatase family." *J Biol Chem*. 281(47):36149-61)。このタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。

[0043] YbjJおよびYbjKは、機能未知のタンパク質である。従って、これらのタンパク質とヘパロサン生成との関連性を示す知見も全く存在しない。

[0044] RybBは、細胞表層ストレスに応答して活性化されるシグマ因子σEに依存して発現する低分子RNAであり、シグマ因子σEの合成を抑制する (Thompson K. M. et al. (2007) "SigmaE regulates and is regulated by a small RNA in

Escherichia coli.” *J Bacteriol.* 189(11):4243-56)。また、RybBは、OmpC およびOmpWの発現抑制にも関与する (Johansen J. et al. (2006) ”Conserved small non-coding RNAs that belong to the sigmaE regulon: role in down-regulation of outer membrane proteins.” *J Mol Biol.* 364(1):1-8)。RybBとヘパロサン生成との関連性を示す知見は全く存在しない。

[0045] YjjYは、機能未知のタンパク質である。従って、このタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見も全く存在しない。

[0046] YjtDは、RNAメチルトランスフェラーゼの一種と推定されるが、実際の機能は未知である (Anantharaman V. et al. (2002) ”SPOUT: a class of methyltransferases that includes spoU and trmD RNA methylase superfamilies, and novel superfamilies of predicted prokaryotic RNA methylases. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 4(1):71-5)。従って、このタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見も全く存在しない。

[0047] ThrB、ThrA、およびThrLは、スレオニン生合成経路の酵素である。ThrBは、ホモセリンから0-ホスホ-L-ホモセリンへの変換反応を触媒するホモセリンキナーゼであり、スレオニンの生合成に関与する (Burr B. et al. (1976) ”Homoserine kinase from *Escherichia coli* K12.” *Eur J Biochem.* 62(3):519-26.)。ThrAは、アスパラギン酸キナーゼIおよびホモセリン脱水素酵素Iの二つの機能を有する酵素であり、スレオニンに加えて、リジンおよびメチオニンの生合成に関与する (Clark RB, Ogilvie J.W. et al. (1972) ”Aspartokinase I-homoserine dehydrogenase I of *Escherichia coli* K12. Subunit molecular weight and nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate binding.” *Biochemistry.* 11(7):1278-82.)。また、ThrLは、thrLABCオペロンのリーダーペプチドであり、スレオニンおよびイソロイシンの濃度に応じてthrLABCオペロンの発現を弱化する (Lynn S.P. et al. (1982) ”Attenuation regulation in the thr operon of *Escherichia coli* K-12: molecular cloning and transcription of the controlling region.” *J Bacteriol.* 152(1):363-71.)。これらのタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は

全く存在しない。

[0048] FruAは、フルクトースPTS透過酵素であり、IIBドメインおよびIICドメインを有する (Prior T.I. and Kornberg H.L. (1988) "Nucleotide sequence of fruA, the gene specifying enzyme IIfu of the phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system in Escherichia coli K12." J Gen Microbiol. 134(10): 2757-68.). このタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。

[0049] PsuKは、シュードウリジンキナーゼであり、tRNAのT Ψ Cループによく見られる修飾RNAであるシュードウリジンの異化に関与する (Solomon L.R. and Breitman T.R. (1971) "Pseudouridine kinase of escherichia coli: a new enzyme." Biochem Biophys Res Commun. 44(2):299-304.). このタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。

[0050] YtfTおよびYjffは、ガラクトースABC輸送担体の膜構成成分であると推測されるが、実際の機能は未知である。従って、これらのタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見も全く存在しない。

[0051] Fbpは、糖新生経路においてフルクトース-1,6-二リン酸からフルクトース-6-リン酸への反応を触媒するフルクトース-1,6-二リン酸脱リン酸化酵素 (fructose-1,6-bisphosphatase) である (Fraenkel D.G. and Horecker B.L. (1965) "Fructose-1,6-diphosphatase and acid hexose phosphatase of Escherichia coli." J Bacteriol. 90(4):837-42.). このタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。

[0052] YagUは、内膜タンパク質と推定されるが、その機能は未知である。従って、このタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見も全く存在しない。

[0053] PaoA (別名YagT) およびPaoB (別名YagS) は、アルデヒド酸化還元酵素YagTSRの構成因子である。PaoAは鉄結合サブユニット、PaoBはフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) 結合サブユニットである (Neumann M. et al. (2009) "A periplasmic aldehyde oxidoreductase represents the first molybdop

terin cytosine dinucleotide cofactor containing molybdo-flavoenzyme from *Escherichia coli*.” FEBS J. 276(10):2762-74)。これらのタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。

[0054] GsiCおよびGsiDは、グルタチオンABC輸送担体の構成因子である。GsiCおよびGsiDは内膜に局在する (Moussatova A. et al. (2008) ”ATP-binding cassette transporters in *Escherichia coli*.” Biochim Biophys Acta. 1778(9): 1757-71.)。これらのタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。

[0055] YliEは、c-di-GMP-特異的ホスホジエステラーゼと推定され、過剰発現によりバイオフィーム形成を促進する (Boehm A. et al. (2009) ”Second messenger signalling governs *Escherichia coli* biofilm induction upon ribosomal stress.” Mol Microbiol. 72(6):1500-16.)。このタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。

[0056] Irp2およびIrp1は、ノンリボソーマルペプチド合成酵素であり、鉄取込みに関与する (Pelludat C. et al. (1998) ”The yersiniabactin biosynthetic gene cluster of *Yersinia enterocolitica*: organization and siderophore-dependent regulation.” J Bacteriol. 180(3):538-46.)。これらのタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。

[0057] BhsA (別名YcfR) は、外膜タンパク質と推定され、バイオフィーム形成およびストレス応答に関与する (Zhang X.S. et al. (2007) ”YcfR (BhsA) influences *Escherichia coli* biofilm formation through stress response and surface hydrophobicity.” J Bacteriol. 189(8):3051-62.)。このタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。

[0058] YcfSは、L,D-トランスペプチダーゼの一種である。YcfSは、ペプチドグリカンのmeso-ジアミノピメリン酸 (DAP) 残基からD-アラニン残基を除去し、当該meso-DAP残基にブラウンリポタンパク質のC末端のリジン残基を結合する反応を触媒する。この反応によって、ペプチドグリカンはブラウンリポタンパク質を介して外膜へ共有結合的に結合する (Magnet S. et al. (2007) ”

Identification of the L,D-transpeptidases responsible for attachment of the Braun lipoprotein to Escherichia coli peptidoglycan.” J Bacteriol. 189(10):3927-31)。このタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。

[0059] LepBは、分泌タンパク質からN末端リーダーペプチドを除去するシグナルペプチダーゼである (Dalbey R.E. (1991) "Leader peptidase." Mol Microbiol. 5(12):2855-60.)。このタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。

[0060] Rncは、二本鎖RNAを切断して5' リン酸基およびヒドロキシル基を生じるRNAseIIIであり、rRNAやファージmRNAのプロセシングに必要である。Rncの主な役割は、遺伝子発現の調節とアンチセンスRNAの機能化である (Robertson H. D. and Dunn J.J. (1975) "Ribonucleic acid processing activity of Escherichia coli ribonuclease III." J Biol Chem. 250(8):3050-6)。このタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。

[0061] Eraは、生存に必須な因子である (Takiff HE et al. (1992) "Locating essential Escherichia coli genes by using mini-Tn10 transposons: the pdxJ operon." J Bacteriol. 174(5):1544-53)。Eraは、Yeast two-hybrid 法によりMazGと相互作用することが分かっている (Zhang J. and Inouye M. (2002) "MazG, a nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase, interacts with Era, an essential GTPase in Escherichia coli." J Bacteriol. 184(19):5323-9)。このタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。

[0062] DapAは、4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthaseである。4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthaseは、リジン生合成酵素の1つであり、ピルビン酸とL-アスパラギン酸 β -セミアルデヒドから(2S, 4S)-4-Hydroxy-2, 3, 4, 5-tetrahydrodipicolinateへの反応を触媒する。同反応は、アスパラギン酸キナーゼIIIの後のリジン生合成において律速段階であると考えられている (Laber B. et al. (1992) "Escherichia coli dihydrodipicolinate synthase

. Identification of the active site and crystallization.” *Biochem J.* 288 (Pt 2):691-5)。このタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。

[0063] GcvRは、転写調節因子と推定されるタンパク質であり、グリシンの生合成遺伝子の発現に関与する。GcvRは、グリシン不在下では、直接GcvAと結合してGlvR/GlvA複合体を形成し、グリシン分解遺伝子群の発現を阻害する。グリシン存在下では、グリシンがGcvRに結合し、GlvR/GlvA複合体の形成を阻害する (Ghrist A.C. et al. (2001) ”GcvR interacts with GcvA to inhibit activation of the *Escherichia coli* glycine cleavage operon.” *Microbiology* 147(Pt 8):2215-21.)。このタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。

[0064] Bcpは、チオレドキシン-1依存性のチオールペルオキシダーゼである (Clarke D.J. et al. (2009) “Interrogating the molecular details of the peroxiredoxin activity of the *Escherichia coli* bacterioferritin comigratory protein using high-resolution mass spectrometry.” *Biochemistry*. 48(18):3904-14)。このタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。

[0065] HyfAは、4つの4Fe-4Sクラスターを有しており、電子輸送に関与すると推定されるタンパク質である (Andrews S.C. et al. (1997) ”A 12-cistron *Escherichia coli* operon (hyf) encoding a putative proton-translocating formate hydrogenlyase system.” *Microbiology*. 143 (Pt 11):3633-47.)。このタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。

[0066] RpoEは、RNAポリメラーゼのサブユニットとして機能するシグマ因子の一種、シグマE (σ^E) である。RpoEは、熱ショックやストレスに応答して膜および膜間部のタンパク質でのプロテアーゼの発現を調節する (Ades S.E. et al. (2003) ”Regulation of the alternative sigma factor sigma(E) during initiation, adaptation, and shutoff of the extracytoplasmic heat shock response in *Escherichia coli*.” *J Bacteriol.* 185(8):2512-9.)。この

タンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。

- [0067] NadBは、L-アスパラギン酸オキシダーゼである。L-アスパラギン酸オキシダーゼは、de novo NAD生合成経路における初発酵素であり、FAD依存的にL-アスパラギン酸からイミノアスパラギン酸への反応を触媒する (Mortarino M. et al. (1996) "L-aspartate oxidase from *Escherichia coli*. I. Characterization of coenzyme binding and product inhibition." *Eur J Biochem.* 239(2):418-26.)。このタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。
- [0068] YfiCは、バリンtRNAのA37 (37位のアデニン) の6位のNをメチル化するメチルトランスフェラーゼである (Golovina A.Y. et al. (2009) *RNA*. "The yfi C gene of *E. coli* encodes an adenine-N6 methyltransferase that specifically modifies A37 of tRNA^{1Val}(cmo5UAC)." 15(6):1134-41.)。tRNAの37位の塩基はアンチコドン・トリプレットに隣接しており、しばしば修飾される。このタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。
- [0069] SrmBは、リボソームの50Sサブユニット集合において初期段階の反応を促進するDEAD-box型RNAヘリカーゼである (Charollais J. et al. (2003) "The DEAD-box RNA helicase SrmB is involved in the assembly of 50S ribosomal subunits in *Escherichia coli*." *Mol Microbiol.* 48(5):1253-65.)。このタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。
- [0070] G1414およびG1413は、機能未知のタンパク質である。従って、これらのタンパク質とヘパロサン生成との関連性を示す知見も全く存在しない。
- [0071] NuoE、NuoF、およびNuoGは、NADHデヒドロゲナーゼIの可溶性フラグメントであり、電子伝達系への電子の入り口として機能する (Braun M. et al. (1998) "Characterization of the overproduced NADH dehydrogenase fragment of the NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from *Escherichia coli*." *Biochemistry.* 37(7):1861-7.)。これらのタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。

[0072] GlmZは、菌体内グルコサミン-6-リン酸の濃度に反応してglmS mRNAの発現および翻訳を転写後修飾によって調節する低分子RNAである (Kalamorz F. et al. (2007) "Feedback control of glucosamine-6-phosphate synthase GlmS expression depends on the small RNA GlmZ and involves the novel protein YhbJ in *Escherichia coli*." *Mol Microbiol.* 65(6):1518-33.)。GlmZは、glmS mRNAの5'-UTRに直接結合し、ループ構造をとっていたglmS mRNAのSD領域を自由にするにより、glmS mRNAの翻訳を活性化する (Urban J. H. and Vogel J. et al. (2008) "Two seemingly homologous noncoding RNAs act hierarchically to activate glmS mRNA translation." *PLoS Biol.* 6(3):e64)。GlmSは、L-グルタミン:D-フルクトース-6-リン酸アミノトランスフェラーゼである。L-グルタミン:D-フルクトース-6-リン酸アミノトランスフェラーゼは、ヘパロサンの前駆体であるUDP-N-アセチルグルコサミン供給経路の第一酵素であり、フルクトース-6-リン酸からグルコサミン-6-リン酸への反応を触媒する。しかしながら、GlmSの活性強化とヘパロサン生成能の関連性を示す知見は存在せず、GlmZとヘパロサン生産との関連性を示す知見も全く存在しない。

[0073] HemY、HemX、およびHemDは、ヘムとコリンの生合成経路の酵素である。HemYは、ヘム生合成経路でプロトポルフィリノゲンIXを酸化してプロトポルフィリンIXを生成するプロトポルフィリノゲンオキシダーゼである (Dailey T. A. et al. (1994) "Expression of a cloned protoporphyrinogen oxidase." *The Journal of Biological Chemistry*, 269:813-815.)。HemXは、コリン生合成経路でウロポルフィリノゲンIIIをメチル化しプレコリンIIを生成するウロポルフィリノゲンIIIメチラーゼと推定されているが、実際の機能は未知である (Sasarman A. et al. (1988) "Nucleotide sequence of the hemX gene, the third member of the Uro operon of *Escherichia coli* K12." *Nucleic Acids Res.* 16(24):11835)。HemDは、ヘムとコリンの生合成経路における共通の最終代謝中間体であるウロポルフィリノゲンIIIを生成するウロポルフィリノゲンIIIシンターゼである (Jordan P. M. and Woodcock S. C. (1991) "

Mutagenesis of arginine residues in the catalytic cleft of Escherichia coli porphobilinogen deaminase that affects dipyrromethane cofactor assembly and tetrapyrrole chain initiation and elongation.” *Biochem J.* 280 (Pt 2):445-9.)。これらのタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。

[0074] RlmL (別名RlmKL) は、23S rRNAのG2445およびG2069をメチル化するメチルトランスフェラーゼである (Kimura S. et al. (2012) ”Base methylations in the double-stranded RNA by a fused methyltransferase bearing unwinding activity.” *Nucleic Acids Res.* 40(9):4071-85.)。RlmLは、融合タンパク質であり、特に、N末側のドメインをRlmL、C末側のドメインをRlmKと呼ぶ場合がある。このタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。

[0075] ArtQ、ArtM、およびArtJは、アルギニンABCトランスポーターのサブユニットである (Linton K.J. and Higgins C.F. (1998) ”The Escherichia coli ATP-binding cassette (ABC) proteins.” *Mol Microbiol.* 28(1):5-13.)。ArtJはペリプラズムに局在すると推測されている。ArtMおよびArtは、疎水性タンパク質であることから、内膜に局在し、ATPaseであるArtPと協同してアルギニンの内膜透過装置として機能すると推測されている。これらのタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。

[0076] RlmC (別名RumB) は、23S rRNAのU747をメチル化するメチルトランスフェラーゼである (Madsen C.T. et al. (2003) ”Identifying the methyltransferases for m(5)U747 and m(5)U1939 in 23S rRNA using MALDI mass spectrometry.” *Nucleic Acids Res.* 31(16):4738-46.)。このタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。

[0077] Ybj0は、内膜タンパク質であると推定されているが、その機能は未知である (Rapp M. et al. (2004) ”Experimentally based topology models for E. coli inner membrane proteins.” *Protein Sci.* 13(4):937-45.)。このタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。

- [0078] YejOは、外膜タンパク質であり、フェーズ可変的なタンパク質排出の機能を持つ (Henderson I.R. and Owen P. (1999) "The major phase-variable outer membrane protein of *Escherichia coli* structurally resembles the immunoglobulin A1 protease class of exported protein and is regulated by a novel mechanism involving Dam and oxyR." *J Bacteriol.* 181(7):2132-41.)。このタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。
- [0079] YejMは、ハイドロラーゼの1種と推定されているが、実際の機能は未知である。従って、このタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。
- [0080] YejLは、機能未知のタンパク質である。従って、このタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。
- [0081] RpoSは、RNAポリメラーゼのサブユニットとして機能するシグマ因子の一種、シグマS (σ^S) である。RpoSは、ストレスに応答してグローバルに遺伝子の発現調節を行なう (Maciag A. et al. (2011) "In vitro transcription profiling of the σ^S subunit of bacterial RNA polymerase: re-definition of the σ^S regulon and identification of σ^S -specific promoter sequence elements." *Nucleic Acids Res.* 39(13):5338-55.)。このタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。
- [0082] YgbNは、グルコン酸輸送に関与するGntファミリーに属するトランスポーターと推定されるタンパク質であり、プロトン駆動型代謝物質取込み担体である可能性が示唆されている (Peekhaus N. et al. (1997) "Characterization of a novel transporter family that includes multiple *Escherichia coli* gluconate transporters and their homologues." *FEMS Microbiol Lett.* 147(2):233-8.)。このタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。
- [0083] YgbMは、機能未知のタンパク質である。従って、このタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。

- [0084] YbgLは、アルドラーゼの1種と推定されているが、実際の機能は未知である。従って、このタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。
- [0085] G3798は、SOS-response transcriptional repressor (RecA-mediated autopeptidase)と推定されるタンパク質である。G3794は、Superinfection exclusion protein Bと推定されるタンパク質である。G3793は、restriction inhibitor protein ral (Antirestriction protein)と推定されるタンパク質である。これらのタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。
- [0086] G3797、G3796、G3795、およびG3792は、機能未知のタンパク質である。従って、これらのタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。
- [0087] RyjAは、約140ntの低分子RNAである (Wassarman K.M. et al. (2001) "Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays." *Genes Dev.* 15(13): 1637-51.)。このRNAとヘパロサンとの関連性を示す知見は全く存在しない。
- [0088] SoxRSは、酸化ストレス応答に関与する転写制御因子である。SoxRは酸化ストレスにより活性化されてSoxSの発現を誘導し、SoxRSはSoxRSレギュロン遺伝子の発現を誘導する (Gu M. and Imlay J.A. (2011) "The SoxRS response of *Escherichia coli* is directly activated by redox-cycling drugs rather than by superoxide." *Mol Microbiol.* 79(5):1136-50.; Touati D. (2000) "Sensing and protecting against superoxide stress in *Escherichia coli*--how many ways are there to trigger soxRS response?" *Redox Rep.* 5(5):287-93.)。SoxRSは、リポポリサッカライドの生成に関与することが知られている (Lee J.H. et al. (2009) "SoxRS-mediated lipopolysaccharide modification enhances resistance against multiple drugs in *Escherichia coli*." *J Bacteriol.* 191(13):4441-50.) が、これらのタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。

- [0089] YjcCは、c-di-GMP特異的なホスホジエステラーゼである (Boehm A. et al. (2009) "Second messenger signalling governs Escherichia coli biofilm induction upon ribosomal stress." Mol Microbiol. 72(6):1500-16.)。YjcCの過剰発現によりバイオフィーム形成を減少することが知られているが、このタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。
- [0090] YjcBは、機能未知タンパク質である。従って、このタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。
- [0091] EfeUおよびEfeOは、二価鉄イオン輸送担体EfeUOBのコンポーネントである。EfeUは透過酵素として、EfeOはペリプラズムに局在するタンパク質として、それぞれ機能する (Cao J. et al. (2007) "EfeUOB (YcdNOB) is a tripartite, acid-induced and CpxAR-regulated, low-pH Fe²⁺ transporter that is cryptic in Escherichia coli K-12 but functional in E. coli O157:H7." Mol Microbiol 65:857-875)。これらのタンパク質とヘパロサン生産との関連性を示す知見は全く存在しない。

図面の簡単な説明

- [0092] [図1]野生型nlpDプロモーター (Pnlp0) の構造を示す図。図中の塩基配列を配列番号165に示す。
- [図2]変異型nlpDプロモーター (Pnlp8) の構造を示す図。図中の塩基配列を配列番号168に示す。

発明を実施するための形態

- [0093] 以下、本発明を詳説する。

- [0094] <1>本発明の細菌

本発明の細菌は、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌であって、表1～3に記載の遺伝子から選択される1またはそれ以上の遺伝子の発現が増大するように改変された細菌である。

- [0095] <1-1>ヘパロサン生産能を有する細菌

本発明において、「ヘパロサン生産能を有する細菌」とは、培地で培養したときに、ヘパロサンを生成し、回収できる程度に培地中に蓄積する能力を

有する細菌をいう。ヘパロサン生産能を有する細菌は、非改変株よりも多い量の目的とするヘパロサンを培地に蓄積することができる細菌であってよい。非改変株としては、野生株や親株が挙げられる。また、ヘパロサン生産能を有する細菌は、例えば、50 mg/L以上、100 mg/L以上、200 mg/L以上、または300 mg/L以上の量のヘパロサンを培地に蓄積することができる細菌であってもよい。

[0096] エシェリヒア属細菌としては、特に制限されないが、微生物学の専門家に知られている分類によりエシェリヒア属に分類されている細菌が挙げられる。エシェリヒア属細菌としては、例えば、Neidhardtらの著書 (Backmann, B. J. 1996. Derivations and Genotypes of some mutant derivatives of *Escherichia coli* K-12, p. 2460-2488. Table 1. In F. D. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella* Cellular and Molecular Biology/Second Edition, American Society for Microbiology Press, Washington, D.C.) に記載されたものが挙げられる。エシェリヒア属細菌としては、例えば、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) が挙げられる。エシェリヒア・コリとしては、例えば、W3110株 (ATCC 27325) やMG1655株 (ATCC 47076) 等のエシェリヒア・コリK-12株；エシェリヒア・コリK5株 (ATCC 23506) ；BL21(DE3)株等のエシェリヒア・コリB株；およびそれらの派生株が挙げられる。

[0097] これらの菌株は、例えば、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (住所12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, United States of America) より分譲を受けることが出来る。すなわち各菌株に対応する登録番号が付与されており、この登録番号を利用して分譲を受けることが出来る (<http://www.atcc.org/>参照)。各菌株に対応する登録番号は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションのカatalogに記載されている。また、BL21(DE3)株は、例えば、ライフテクノロジーズ社より入手可能である (製品番号 C6000-03)。

[0098] 本発明の細菌は、本来的にヘパロサン生産能を有するものであってもよく、ヘパロサン生産能を有するように改変されたものであってもよい。ヘパロ

サン生産能を有する細菌は、例えば、上記のような細菌にヘパロサン生産能を付与することにより取得できる。

[0099] ヘパロサン生産能は、ヘパロサン生産に関与するタンパク質をコードする遺伝子を導入することにより、付与できる。ヘパロサン生産に関与するタンパク質としては、グリコシルトランスフェラーゼやヘパロサン排出担体タンパク質が挙げられる。本発明においては、1種の遺伝子を導入してもよく、2種またはそれ以上の遺伝子を導入してもよい。遺伝子の導入は、後述する遺伝子のコピー数を増加させる手法と同様に行うことができる。

[0100] ここでいう「グリコシルトランスフェラーゼ」とは、N-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) および／またはグルクロン酸 (GlcUA) を糖鎖非還元末端に付加し、ヘパロサン鎖を伸長する反応を触媒する活性を有するタンパク質をいう。また、同活性を、「グリコシルトランスフェラーゼ活性」ともいう。グリコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子としては、kfiA遺伝子、kfiC遺伝子、pmHS1遺伝子が挙げられる。

[0101] kfiA遺伝子およびkfiC遺伝子としては、エシェリヒア・コリK5株のkfiA遺伝子およびkfiC遺伝子が挙げられる。エシェリヒア・コリK5株のkfiA遺伝子がコードするKfiAタンパク質は、UDP-GlcNAcを基質として、GlcNAcを糖鎖非還元末端に付加する。エシェリヒア・コリK5株のkfiC遺伝子がコードするKfiCタンパク質は、UDP-GlcUAを基質として、GlcUAを糖鎖非還元末端に付加する。エシェリヒア・コリK5株のkfiAおよびkfiC遺伝子は、kfiBおよびkfiD遺伝子とともに、kfiABCDオペロン (Region2ともいう) を構成する。エシェリヒア・コリK5株のkfiABCDオペロンを含む領域の塩基配列を配列番号24に示す。配列番号24に示す塩基配列中、kfiA、kfiB、kfiC、kfiD遺伝子は、それぞれ、445～1164位の配列、1593～3284位の配列、4576～6138位の配列、6180～7358位の配列に相当する。エシェリヒア・コリK5株のKfiA、KfiB、KfiC、KfiDタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号25～28に示す。

[0102] pmHS1遺伝子としては、パスツレラ・ムルトシダ タイプD株のpmHS1遺伝子が挙げられる。パスツレラ・ムルトシダ タイプD株のpmHS1遺伝子がコードす

るPmHS1タンパク質は、UDP-GlcNAcおよびUDP-GlcUAの両方を基質として、GlcNAcおよびGlcUAを交互に糖鎖非還元末端に付加する。パスツレラ・ムルトシダタイプD株のpmHS1遺伝子の塩基配列、及び同遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列は、例えば、NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 等の公用データベースから取得できる。

[0103] ここでいう「ヘパロサン排出担体タンパク質」とは、細胞膜を通してヘパロサン鎖を細胞外へ排出する活性を有するタンパク質をいう。また、同活性を、「ヘパロサン排出活性」ともいう。ヘパロサン排出担体タンパク質をコードする遺伝子としては、kpsC、kpsD、kpsE、kpsM、kpsS、およびkpsT遺伝子が挙げられる。kpsC、kpsD、kpsE、kpsM、kpsS、およびkpsT遺伝子としては、エシェリヒア・コリK5株やエシェリヒア・コリB株のkpsC、kpsD、kpsE、kpsM、kpsS、およびkpsT遺伝子が挙げられる。これらの株のkpsC、kpsD、kpsE、およびkpsS遺伝子は、kpsFおよびkpsU遺伝子とともに、kpsFEDUCSオペロン (Region1ともいう) を構成する。また、これらの株のkpsMおよびkpsT遺伝子は、kpsMTオペロン (Region3ともいう) を構成する。これらの株のkpsC、kpsD、kpsE、kpsM、kpsS、およびkpsT遺伝子の塩基配列、及び同遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列は、例えば、NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 等の公用データベースから取得できる。

[0104] 導入する遺伝子は、用いる細菌の種類等に応じて適宜選択できる。例えば、エシェリヒア・コリB株は、ヘパロサン排出担体タンパク質をコードする遺伝子を有するが、グリコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を有さない。よって、グリコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を導入することにより、エシェリヒア・コリB株にヘパロサン生産能を付与することができる。また、例えば、エシェリヒア・コリK-12株は、グリコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子とヘパロサン排出担体タンパク質をコードする遺伝子の両方を有さない。よって、グリコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子とヘパロサン排出担体タンパク質をコードする遺伝子の両方を導入することにより、エシェリヒア・コリK-12株にヘパロサン生産能を付与

することができる。

[0105] すなわち、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌としては、例えば、エシェリヒア・コリK5株；BL21(DE3)株等のエシェリヒア・コリB株にエシェリヒア・コリK5株由来のkfiA遺伝子およびkfiC遺伝子を導入した株；W3110株やMG1655株等のエシェリヒア・コリK-12株にエシェリヒア・コリK5株由来のkfiA遺伝子およびkfiC遺伝子、ならびにエシェリヒア・コリK5株またはエシェリヒア・コリB株由来のkpsC、kpsD、kpsE、kpsM、kpsS、およびkpsT遺伝子を導入した株；ならびにそれらの派生株が挙げられる。エシェリヒア・コリB株にエシェリヒア・コリK5株由来のkfiA遺伝子およびkfiC遺伝子を導入した株として、具体的には、例えば、実施例に記載のエシェリヒア・コリBL21(DE3)/pVK9-region2が挙げられる。

[0106] また、ヘパロサン生産能を有する細菌は、ヘパロサン生産に関与するタンパク質をコードする遺伝子の内、同細菌がもともと有する遺伝子の発現が増強されるよう改変されていてもよい。すなわち、例えば、エシェリヒア・コリK5株を、ヘパロサン生産に関与するタンパク質をコードする1またはそれ以上の遺伝子の発現が増強されるよう改変してもよい。また、例えば、エシェリヒア・コリB株を、ヘパロサン排出担体タンパク質をコードする1またはそれ以上の遺伝子の発現が増強されるよう改変してもよい。

[0107] また、ヘパロサン生産能を有する細菌は、ヘパロサン生産能を損なわない限り、その他の改変がなされていてもよい。例えば、ヘパロサン生産能を有する細菌は、kfiB、kfiD、kpsF、およびkpsU遺伝子から選択される1またはそれ以上の遺伝子の発現が増強されるよう改変されていてもよい。すなわち、例えば、グリコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子の導入の際には、Region2をまとめて導入してもよく、グリコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子とヘパロサン排出担体タンパク質をコードする遺伝子の導入の際には、Region1~3をまとめて導入してもよい。

[0108] なお、ヘパロサン生産能の付与等の細菌の改変に使用される遺伝子は、元の機能が維持されたタンパク質をコードする限り、上記例示した遺伝子や公

知の塩基配列を有する遺伝子に限られず、そのバリエーションであってもよい。

「元の機能が維持された」とは、例えば、グリコシルトランスフェラーゼにあっては、タンパク質のバリエーションがグリコシルトランスフェラーゼ活性を有することをいい、ヘパロサン排出担体タンパク質にあっては、タンパク質のバリエーションがヘパロサン排出活性を有することをいう。例えば、ヘパロサン生産能の付与等の細菌の改変に使用される遺伝子は、公知のタンパク質のアミノ酸配列において、1若しくは数個の位置での1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子であってもよい。遺伝子やタンパク質のバリエーションについては、表1～3に記載の遺伝子およびそれらがコードするタンパク質の保存的バリエーションに関する記載を準用できる。

[0109] <1-2>表1～3に記載の遺伝子の発現の増大

本発明の細菌は、表1～3に記載の遺伝子から選択される1またはそれ以上の遺伝子の発現が増大するように改変されている。本発明の細菌は、ヘパロサン生産能を有する細菌を、表1～3に記載の遺伝子から選択される1またはそれ以上の遺伝子の発現が増大するように改変することによって得ることができる。また、本発明の細菌は、表1～3に記載の遺伝子から選択される1またはそれ以上の遺伝子の発現が増大するように細菌を改変した後に、ヘパロサン生産能を付与することによっても得ることができる。なお、本発明の細菌は、表1～3に記載の遺伝子から選択される1またはそれ以上の遺伝子の発現が増大するように改変されたことにより、ヘパロサン生産能を獲得したものであってもよい。本発明において、本発明の細菌を構築するための改変は、任意の順番で行うことができる。

[0110] 「表1～3に記載の遺伝子」とは、具体的には、rbsR、rbsK、rbsB、hsrA、glgB、glgX、micF、rcsD、rcsB、ybiX、ybiI、ybiJ、ybiC、ybiB、rfaH、nusG、pcoR、pcoS、pcoE、yhcN、yhcO、aaeB、aaeA、aaeX、g1455、alpA、g1453、yrbA、mlaB、mlaC、mlaD、mlaE、mlaF、yrbG、norW、ybjI、ybjJ、ybjK、rybB、yjjY、yjtD、thrL、thrA、thrB、fruA、psuK、ytfT、yjfF、fbp、ya

glU、paoA、paoB、gsiC、gsiD、yliE、irp2、irp1、bhsA、ycfS、lepB、rnc、era、dapA、gcvR、bcp、hyfA、rpoE、nadB、yfiC、srmB、g1414、g1413、nuoE、nuoF、nuoG、glmZ、hemY、hemX、hemD、rlmL、artQ、artM、artJ、rlmC、ybj0、yej0、yejM、yejL、rpoS、ygbN、ygbM、ygbL、g3798、g3797、g3796、g3795、g3794、g3793、g3792、ryjA、soxR、soxS、yjcC、yjcB、efeU、およびefe0遺伝子をいう。なお、表1～3に記載の遺伝子を「表1～3の遺伝子」ともいう。

[0111] rbsR、rbsK、およびrbsB遺伝子は、D-リボースの取り込みに関与する因子をコードする遺伝子である。rbsR遺伝子は、rbsオペロンのリプレッサーをコードする。rbsK遺伝子は、リボキナーゼをコードする。rbsB遺伝子は、リボースABCトランスポーターを構成するサブユニットの1つをコードする。Escherichia coli K-12 MG1655株のrbsR、rbsK、およびrbsB遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、それぞれ、3,936,250～3,937,242位の配列、3,935,317～3,936,246位の配列、および3,934,301～3,935,191位の配列に相当する。また、MG1655株のRbsR、RbsK、およびRbsBタンパク質は、それぞれ、GenBank accession NP_418209 (version NP_418209.1 GI:16131621)、GenBank accession NP_418208 (version NP_418208.1 GI:16131620)、およびGenBank accession NP_418207 (version NP_418207.1 GI:16131619)として登録されている。

[0112] hsrA遺伝子は、メジャー・ファシリテーター・スーパーファミリー (MFS) の1種と推定される内膜タンパク質をコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のhsrA遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、3,937,208～3,938,635位の配列の相補配列に相当する。また、MG1655株のHsrAタンパク質は、GenBank accession NP_418210 (version NP_418210.1 GI:16131622)として登録されている。

[0113] エシェリヒア・コリK5株のrbsB、rbsK、rbsR、hsrA遺伝子を含む領域の塩

基配列を配列番号 29 に示す。配列番号 29 に示す塩基配列中、rbsB、rbsK、rbsR 遺伝子は、それぞれ、800～1690 位の配列、1816～2745 位の配列、2749～3741 位の配列に相当する。また、配列番号 29 に示す塩基配列中、hsrA 遺伝子は、3707～5134 位の配列の相補配列に相当する。エシェリヒア・コリ K5 株の RbsR、RbsK、RbsB、HsrA タンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号 30～33 に示す。

[0114] glgB 遺伝子は、グリコーゲン分枝酵素 (1,4- α -グルカン分枝酵素) をコードする遺伝子である。glgX 遺伝子は、グリコーゲン脱分枝酵素をコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655 株の glgB および glgX 遺伝子は、NCBI データベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990) として登録されているゲノム配列中、それぞれ、3,569,339～3,571,525 位の配列の相補配列および 3,567,369～3,569,342 位の配列の相補配列に相当する。また、MG1655 株の GlgB および GlgX タンパク質は、それぞれ、GenBank accession NP_417890 (version NP_417890.1 GI:16131306) および GenBank accession NP_417889 (version NP_417889.1 GI:16131305) として登録されている。

[0115] エシェリヒア・コリ K5 株の glgB および glgX 遺伝子を含む領域の塩基配列を配列番号 34 に示す。配列番号 34 に示す塩基配列中、glgB および glgX 遺伝子は、それぞれ、989～3175 位の配列および 3172～5145 位の配列に相当する。エシェリヒア・コリ K5 株の GlgB および GlgX タンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号 35 および 36 に示す。

[0116] micF 遺伝子は、OmpF の発現抑制に関与するアンチセンス RNA をコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655 株の micF 遺伝子は、NCBI データベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990) として登録されているゲノム配列中、2,311,106～2,311,198 位の配列に相当する。

[0117] rcsD および rcsB 遺伝子は、転写因子をコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655 株の rcsD および rcsB 遺伝子は、NCBI データベースに

、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、それぞれ、2,311,510～2,314,182位および2,314,199～2,314,849位の配列に相当する。また、MG1655株のRcsDおよびRcsBタンパク質は、それぞれ、GenBank accession NP_416720 (version NP_416720.1 GI:16130153)およびGenBank accession NP_416721 (version NP_416721.1 GI:16130154)として登録されている。

[0118] エシェリヒア・コリK5株のrcsB、rcsD、およびmicF遺伝子を含む領域の塩基配列を配列番号43に示す。配列番号43に示す塩基配列中、rcsB、rcsD、およびmicF遺伝子は、それぞれ、3312～3962位の配列、623～3295位の配列、219～311位の配列に相当する。エシェリヒア・コリK5株のRcsBおよびRcsDタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号44および45に示す。

[0119] ybiX、ybiI、ybiJ、ybiC、およびybiB遺伝子は、機能未知の遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のybiX、ybiI、ybiJ、ybiC、およびybiB遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、それぞれ、837,753～838,430位の配列の相補配列、837,413～837,679位の配列の相補配列、836,888～837,148位の配列の相補配列、835,574～836,659位の配列、および834,471～835,433位の配列に相当する。また、MG1655株のYbiX、YbiI、YbiJ、YbiC、およびYbiBタンパク質は、それぞれ、GenBank accession NP_415325 (version NP_415325.4 GI:90111170)、GenBank accession NP_415324 (version NP_415324.1 GI:16128771)、GenBank accession NP_415323 (version NP_415323.1 GI:16128770)、GenBank accession NP_415322 (version NP_415322.1 GI:16128769)、およびGenBank accession NP_415321 (version NP_415321.1 GI:16128768)として登録されている。

[0120] エシェリヒア・コリK5株のybiX、ybiI、ybiJ、ybiC、ybiB遺伝子を含む領域の塩基配列を配列番号37に示す。配列番号37に示す塩基配列中、ybiX、ybiI、ybiJ遺伝子は、それぞれ、718～1395位の配列、1469～1735位の配列、2000～2260位の配列に相当する。また、配列番号37に示す塩基配列中、y

biCおよびybiB遺伝子は、2488～3574位の配列の相補配列および3715～4677位の配列の相補配列に相当する。エシェリヒア・コリK5株のYbiX、YbiI、YbiJ、YbiC、YbiBタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号38～42に示す。

[0121] rfaHおよびnusG遺伝子は、転写因子をコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のrfaHおよびnusG遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、それぞれ、4,022,356～4,022,844位の配列の相補配列および4,175,766～4,176,311位の配列に相当する。また、MG1655株のRfaHおよびNusGタンパク質は、それぞれ、GenBank accession NP_418284 (version NP_418284.1 GI:16131688)およびGenBank accession NP_418409 (version NP_418409.1 GI:16131812)として登録されている。

[0122] エシェリヒア・コリBL21(DE3)株のrfaH遺伝子の塩基配列を配列番号46に、同遺伝子がコードするRfaHタンパク質のアミノ酸配列を配列番号47に、それぞれ示す。エシェリヒア・コリBL21(DE3)株のnusG遺伝子の塩基配列を配列番号48に、同遺伝子がコードするNusGタンパク質のアミノ酸配列を配列番号49に、それぞれ示す。

[0123] pcoR、pcoS、およびpcoE遺伝子は、銅耐性に関与する因子をコードする遺伝子である。pcoR遺伝子は、pcoオペロンのアクチベーターに相同なタンパク質をコードする。pcoS遺伝子は、二成分制御系のセンサータンパク質に相同なタンパク質をコードする。pcoE遺伝子は、銅結合タンパク質をコードする。Escherichia coli K-12 MG1655株のゲノムにおいて、これらの遺伝子はアノテートされていない。

[0124] エシェリヒア・コリK5株のpcoR、pcoS、およびpcoE遺伝子を含む領域の塩基配列を配列番号50に示す。配列番号50に示す塩基配列中、pcoR、pcoS、およびpcoE遺伝子は、それぞれ、128～808位の配列、805～2205位の配列、2423～2857位の配列に相当する。エシェリヒア・コリK5株のPcoR、PcoS、およびPcoEタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号51～53に示す。

す。

[0125] yhcN遺伝子は、ストレス応答に関与する因子をコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のyhcN遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、3,383,560～3,383,823位の配列に相当する。また、MG1655株のYhcNタンパク質は、GenBank accession NP_417705 (version NP_417705.2 GI:90111561)として登録されている。

[0126] yhcO遺伝子は、RNaseの阻害因子に相同なタンパク質をコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のyhcO遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、3,383,879～3,384,151位の配列の相補配列に相当する。また、MG1655株のYhcOタンパク質は、GenBank accession NP_417706 (version NP_417706.1 GI:16131129)として登録されている。

[0127] aaeBおよびaaeA遺伝子は、4-ヒドロキシ安息香酸の排出担体のサブユニットをコードする遺伝子である。aaeX遺伝子は、排出担体と推定されるタンパク質をコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のaaeB、aaeA、およびaaeX遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、それぞれ、3,384,243～3,386,210位の配列の相補配列、3,386,216～3,387,148位の配列の相補配列、および3,387,156～3,387,359位の配列の相補配列に相当する。また、MG1655株のAaeB、AaeA、およびAaeXタンパク質は、それぞれ、GenBank accession NP_417707 (version NP_417707.1 GI:16131130)、GenBank accession NP_417708 (version NP_417708.1 GI:16131131)、およびGenBank accession NP_417709 (version NP_417709.2 GI:90111562)として登録されている。

[0128] エシェリヒア・コリK5株のyhcN、yhcO、aaeB、aaeA、およびaaeX遺伝子を含む領域の塩基配列を配列番号54に示す。配列番号54に示す塩基配列中、yhcN、yhcO、aaeB、aaeA、およびaaeX遺伝子は、それぞれ、63～326位の配

列、382～654位の配列の相補配列、746～2713位の配列の相補配列、2719～3651位の配列の相補配列、3659～3931位の配列の相補配列に相当する。エシェリヒア・コリK5株のYhcN、YhcO、AaeB、AaeA、およびAaeXタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号55～59に示す。

[0129] g1455およびg1453遺伝子は、機能未知の遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のゲノムにおいて、これらの遺伝子はアノテートされていない。

[0130] alpA遺伝子は、intA遺伝子の発現調節因子をコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のalpA遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、2,756,666～2,756,878位の配列に相当する。また、MG1655株のAlpAタンパク質は、GenBank accession NP_417113 (version NP_417113.1 GI:16130542)として登録されている。

[0131] エシェリヒア・コリK5株のg1455、alpA、およびg1453遺伝子を含む領域の塩基配列を配列番号60に示す。配列番号60に示す塩基配列中、g1455、alpA、およびg1453遺伝子は、それぞれ、568～1140位の配列の相補配列、1226～1486位の配列の相補配列、2389～2529位の配列に相当する。エシェリヒア・コリK5株のG1455、AlpA、およびG1453タンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号61～63に示す。

[0132] yrbA遺伝子（別名ibaG）は、DNA結合型転写因子と推定されるタンパク質をコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のyrbA遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、3,334,571～3,334,825位の配列の相補配列に相当する。また、MG1655株のYrbAタンパク質は、GenBank accession NP_417657 (version NP_417657.2 GI:90111555)として登録されている。

[0133] mlaB、mlaC、mlaD、mlaE、およびmlaF遺伝子は、リン脂質ABCトランスポーターの構成因子をコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655

株のmlaB、mlaC、mlaD、mlaE、およびmlaF遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、それぞれ、3,334,985～3,335,278位の配列の相補配列、3,335,278～3,335,913位の配列の相補配列、3,335,932～3,336,483位の配列の相補配列、3,336,488～3,337,270位の配列の相補配列、および3,337,278～3,338,087位の配列の相補配列に相当する。また、MG1655株のMlaB、MlaC、MlaD、MlaE、およびMlaFタンパク質は、それぞれ、GenBank accession NP_417658 (version NP_417658.4 GI:90111556)、GenBank accession NP_417659 (version NP_417659.1 GI:16131082)、GenBank accession NP_417660 (version NP_417660.1 GI:16131083)、GenBank accession NP_417661 (version NP_417661.1 GI:16131084)、およびGenBank accession NP_417662 (version NP_417662.1 GI:16131085)として登録されている。

[0134] yrbG遺伝子は、Na⁺/Ca²⁺交換輸送体と推定されるタンパク質をコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のyrbG遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、3,338,297～3,339,274位の配列に相当する。また、MG1655株のYrbGタンパク質は、GenBank accession NP_417663 (version NP_417663.1 GI:16131086)として登録されている。

[0135] エシェリヒア・コリK5株のyrbA、mlaB、mlaC、mlaD、mlaE、mlaF、およびyrbG遺伝子を含む領域の塩基配列を配列番号64に示す。配列番号64に示す塩基配列中、yrbA、mlaB、mlaC、mlaD、mlaE、mlaF、およびyrbG遺伝子は、それぞれ、977～1246位の配列の相補配列、1391～1780位の配列の相補配列、1684～2319位の配列の相補配列、2338～2889位の配列の相補配列、2894～3676位の配列の相補配列、3684～4493位の配列の相補配列、4703～5680位の配列に相当する。エシェリヒア・コリK5株のYrbA、MlaB、MlaC、MlaD、MlaE、MlaF、およびYrbGタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号65～71に示す。

[0136] norW遺伝子は、N0還元酵素をコードする遺伝子である。Escherichia coli

K-12 MG1655株のnorW遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、2,831,934～2,833,067位の配列に相当する。また、MG1655株のNorWタンパク質は、GenBank accession NP_417191 (version NP_417191.1 GI:16130618)として登録されている。

[0137] エシェリヒア・コリK5株のnorW遺伝子を含む領域の塩基配列を配列番号72に示す。配列番号72に示す塩基配列中、norW遺伝子は、1201～2334位の配列に相当する。エシェリヒア・コリK5株のNorWタンパク質のアミノ酸配列を、配列番号73に示す。

[0138] ybjI遺伝子は、フラビンモノヌクレオチド (FMN) リン酸化酵素をコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のybjI遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、884,539～885,354位の配列の相補配列に相当する。また、MG1655株のYbjIタンパク質は、GenBank accession NP_415365 (version NP_415365.4 GI:90111176)として登録されている。

[0139] ybjJおよびybjK遺伝子は、機能未知の遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のybjJおよびybjK遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、それぞれ、885,354～886,562位の配列の相補配列および886,646～887,182位の配列に相当する。また、MG1655株のYbjJおよびYbjKタンパク質は、それぞれ、GenBank accession NP_415366 (version NP_415366.1 GI:16128813)およびGenBank accession NP_415367 (version NP_415367.1 GI:16128814)として登録されている。

[0140] rybB遺伝子は、OmpCおよびOmpWの発現抑制に関与する低分子RNAをコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のrybB遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、887,199～887,277位の配列

の相補配列に相当する。

- [0141] エシェリヒア・コリK5株のybjI、ybjJ、ybjK、およびrybB遺伝子を含む領域の塩基配列を配列番号74に示す。配列番号74に示す塩基配列中、ybjI、ybjJ、ybjK、およびrybB遺伝子は、それぞれ、117～932位の配列の相補配列、932～2140位の配列の相補配列、2224～2760位の配列、2777～2855位の配列の相補配列に相当する。エシェリヒア・コリK5株のYbjI、YbjJ、およびYbjKタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号75～77に示す。
- [0142] yjjY遺伝子は、機能未知の遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のyjjY遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、4,638,425～4,638,565位の配列に相当する。また、MG1655株のYjjYタンパク質は、GenBank accession NP_418819 (version NP_418819.1 GI:16132219)として登録されている。
- [0143] yjtD遺伝子は、RNAメチルトランスフェラーゼの一種と推定されるタンパク質をコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のyjtD遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、4,638,965～4,639,651位の配列に相当する。また、MG1655株のYjtDタンパク質は、GenBank accession NP_418820 (version NP_418820.1 GI:16132220)として登録されている。
- [0144] thrL、thrA、およびthrB遺伝子は、スレオニン生合成経路の酵素をコードする遺伝子である。thrB遺伝子は、ホモセリンキナーゼをコードする。thrA遺伝子は、アスパラギン酸キナーゼIおよびホモセリン脱水素酵素Iの二つの機能を有する酵素をコードする。thrL遺伝子は、thrLABCオペロンのリーダーペプチドをコードする。Escherichia coli K-12 MG1655株のthrL、thrA、およびthrB遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、それぞれ、190～255位の配列、337～2,799位の配列、および2,801～3,733

位の配列に相当する。また、MG1655株のThrL、ThrA、およびThrBタンパク質は、それぞれ、GenBank accession NP_414542 (version NP_414542.1 GI:16127995)、GenBank accession NP_414543 (version NP_414543.1 GI:16127996)、およびGenBank accession NP_414544 (version NP_414544.1 GI:16127997)として登録されている。

[0145] エシェリヒア・コリK5株のyjjY、yjtD、thrL、thrA、およびthrB遺伝子を含む領域の塩基配列を配列番号78に示す。配列番号78に示す塩基配列中、yjjY、yjtD、thrL、thrA、およびthrB遺伝子は、それぞれ、124～264位の配列、664～1350位の配列、1564～1629位の配列、1711～4173位の配列、4175～5107位の配列に相当する。エシェリヒア・コリK5株のYjjY、YjtD、ThrL、ThrA、およびThrBタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号79～83に示す。

[0146] fruA遺伝子は、フルクトースPTS透過酵素をコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のfruA遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、2,257,741～2,259,432位の配列の相補配列に相当する。また、MG1655株のFruAタンパク質は、GenBank accession NP_416672 (version NP_416672.1 GI:16130105)として登録されている。

[0147] psuK遺伝子は、シュードウリジンキナーゼをコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のpsuK遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、2,256,377～2,257,318位の配列の相補配列に相当する。また、MG1655株のPsuKタンパク質は、GenBank accession NP_416671 (version NP_416671.1 GI:16130104)として登録されている。

[0148] エシェリヒア・コリK5株のfruAおよびpsuK遺伝子を含む領域の塩基配列を配列番号84に示す。配列番号84に示す塩基配列中、fruAおよびpsuK遺伝子は、それぞれ、897～2588位の配列および3165～3953位の配列に相当する。エシェリヒア・コリK5株のFruAおよびPsuKタンパク質のアミノ酸配列を、そ

れぞれ、配列番号 85 および 86 に示す。

[0149] ytfT および yj fF 遺伝子は、ガラクトース ABC 輸送担体の膜構成成分と推定されるタンパク質をコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655 株の ytfT および yj fF 遺伝子は、NCBI データベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990) として登録されているゲノム配列中、それぞれ、4,450,594~4,451,619 位の配列および 4,451,606~4,452,601 位の配列に相当する。また、MG1655 株の YtfT および Yj fF タンパク質は、それぞれ、GenBank accession NP_418651 (version NP_418651.3 GI:145698343) および GenBank accession NP_418652 (version NP_418652.2 GI:90111710) として登録されている。

[0150] fbp 遺伝子は、フルクトース-1,6-ニリン酸脱リン酸化酵素 (fructose-1,6-bisphosphatase) をコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655 株の fbp 遺伝子は、NCBI データベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990) として登録されているゲノム配列中、4,452,634~4,453,632 位の配列の相補配列に相当する。また、MG1655 株の Fbp タンパク質は、GenBank accession NP_418653 (version NP_418653.1 GI:16132054) として登録されている。

[0151] エシェリヒア・コリ K5 株の ytfT、yj fF、および fbp 遺伝子を含む領域の塩基配列を配列番号 87 に示す。配列番号 87 に示す塩基配列中、ytfT、yj fF、および fbp 遺伝子は、それぞれ、252~1277 位の配列、1264~2259 位の配列、2292~3290 位の配列の相補配列に相当する。エシェリヒア・コリ K5 株の YtfT、Yj fF、および Fbp タンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号 88~90 に示す。

[0152] yagU 遺伝子は、内膜タンパク質と推定されるタンパク質をコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655 株の yagU 遺伝子は、NCBI データベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990) として登録されているゲノム配列中、302,215~302,829 位の配列に相当する。また、MG1655 株の YagU タンパク質は、GenBank accession NP_414821 (

version NP_414821.1 GI:16128272)として登録されている。

[0153] paoA遺伝子（別名yagT）およびpaoB遺伝子（別名yagS）は、アルデヒド酸化還元酵素の構成因子をコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のpaoAおよびpaoB遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、それぞれ、301,108～301,797位の配列の相補配列および300,155～301,111位の配列の相補配列に相当する。また、MG1655株のPaoAおよびPaoBタンパク質は、それぞれ、GenBank accession NP_414820 (version NP_414820.1 GI:16128271)およびGenBank accession NP_414819 (version NP_414819.1 GI:16128270)として登録されている。

[0154] エシェリヒア・コリK5株のyagU、paoA、およびpaoB遺伝子を含む領域の塩基配列を配列番号91に示す。配列番号91に示す塩基配列中、yagU、paoA、およびpaoB遺伝子は、それぞれ、117～731位の配列の相補配列、1149～1838位の配列、1835～2791位の配列に相当する。エシェリヒア・コリK5株のYagU、PaoA、およびPaoBタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号92～94に示す。

[0155] gsiCおよびgsiD遺伝子は、グルタチオンABC輸送担体の構成因子をコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のgsiCおよびgsiD遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、それぞれ、870,190～871,110位の配列および871,113～872,024位の配列に相当する。また、MG1655株のGsiCおよびGsiDタンパク質は、それぞれ、GenBank accession NP_415352 (version NP_415352.1 GI:16128799)およびGenBank accession NP_415353 (version NP_415353.1 GI:16128800)として登録されている。

[0156] yliE遺伝子は、c-di-GMP-特異的ホスホジエステラーゼと推定されるタンパク質をコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のyliE遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、872,202～87

4,550位の配列に相当する。また、MG1655株のYliEタンパク質は、GenBank accession NP_415354 (version NP_415354.1 GI:16128801)として登録されている。

[0157] エシェリヒア・コリK5株のgsiC、gsiD、およびyliE遺伝子を含む領域の塩基配列を配列番号95に示す。配列番号95に示す塩基配列中、gsiC、gsiD、およびyliE遺伝子は、それぞれ、264～1184位の配列、1187～2098位の配列、2276～4624位の配列に相当する。エシェリヒア・コリK5株のGsiC、GsiD、およびYliEタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号96～98に示す。

[0158] irp2およびirp1遺伝子は、ノンリボソーマルペプチド合成酵素をコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のゲノムにおいて、irp2およびirp1遺伝子はアノテートされていない。本発明においては、irp2およびirp1遺伝子を総称して「irp遺伝子」という場合がある。

[0159] エシェリヒア・コリK5株のirp遺伝子の一部を含む領域の塩基配列を配列番号99に示す。同領域は、irp2遺伝子の後半部分（全長6108bpの内、2781～6108位の部分；全長の約54%に相当）とirp1遺伝子の前半部分（全長9492bpの内、1～2530位の部分；全長の約27%に相当）を含む。また、エシェリヒア・コリK5株のirp2遺伝子の塩基配列を配列番号100に、同遺伝子がコードするIrp2タンパク質のアミノ酸配列を配列番号101に、それぞれ示す。また、エシェリヒア・コリK5株のirp1遺伝子の塩基配列を配列番号102に、同遺伝子がコードするIrp1タンパク質のアミノ酸配列を配列番号103に、それぞれ示す。

[0160] bhsA遺伝子（別名ycfR）は、外膜タンパク質と推定されるタンパク質をコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のbhsA遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、1,168,296～1,168,553位の配列に相当する。また、MG1655株のBhsAタンパク質は、GenBank accession NP_415630 (version NP_415630.1 GI:16129075)として登録されている。

- [0161] ycfS遺伝子は、L,D-トランスペプチダーゼの一種をコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のycfS遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、1,168,635～1,169,597位の配列の相補配列に相当する。また、MG1655株のYcfSタンパク質は、GenBank accession NP_415631 (version NP_415631.1 GI:16129076)として登録されている。
- [0162] エシェリヒア・コリK5株のbhsAおよびycfS遺伝子を含む領域の塩基配列を配列番号104に示す。配列番号104に示す塩基配列中、bhsAおよびycfS遺伝子は、それぞれ、440～697位の配列および779～1741位の配列の相補配列に相当する。エシェリヒア・コリK5株のBhsAおよびYcfSタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号105および106に示す。
- [0163] lepB遺伝子は、シグナルペプチダーゼをコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のlepB遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、2,702,357～2,703,331位の配列の相補配列に相当する。また、MG1655株のLepBタンパク質は、GenBank accession NP_417063 (version =NP_417063.1 GI:16130493)として登録されている。
- [0164] rnc遺伝子は、RNaseIIIをコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のrnc遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、2,701,405～2,702,085位の配列の相補配列に相当する。また、MG1655株のRncタンパク質は、GenBank accession NP_417062 (version NP_417062.1 GI:16130492)として登録されている。
- [0165] era遺伝子は、生存に必須な因子をコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のera遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、2,700,503～2,701,408位の配列の相補配列に相当する。また、MG1655株のEraタンパク質は、GenBank accession NP_417061 (version NP_

417061.1 GI:16130491)として登録されている。

- [0166] エシェリヒア・コリK5株のlepB、rnc、およびera遺伝子を含む領域の塩基配列を配列番号107に示す。配列番号107に示す塩基配列中、lepB、rnc、およびera遺伝子は、それぞれ、1344～2318位の配列、2590～3270位の配列、および3267～4172位の配列に相当する。エシェリヒア・コリK5株のLepB、Rnc、およびEraタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号108～110に示す。
- [0167] dapA遺伝子は、4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthaseをコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のdapA遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、2,596,904～2,597,782位の配列の相補配列に相当する。また、MG1655株のDapAタンパク質は、GenBank accession NP_416973 (version NP_416973.1 GI:16130403)として登録されている。
- [0168] gcvR遺伝子は、転写調節因子と推定されるタンパク質をコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のgcvR遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、2,597,928～2,598,500位の配列に相当する。また、MG1655株のGcvRタンパク質は、GenBank accession NP_416974 (version NP_416974.4 GI:90111443)として登録されている。
- [0169] bcp遺伝子は、チオールペルオキシダーゼをコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のbcp遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、2,598,500～2,598,970位の配列に相当する。また、MG1655株のBcpタンパク質は、GenBank accession NP_416975 (version NP_416975.1 GI:16130405)として登録されている。
- [0170] hyfA遺伝子は、電子輸送に関与すると推定されるタンパク質をコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のhyfA遺伝子は、NCBI

データベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、2,599,223～2,599,840位の配列に相当する。また、MG1655株のhyfAタンパク質は、GenBank accession NP_416976 (version NP_416976.4 GI:90111444)として登録されている。

[0171] エシェリヒア・コリK5株のdapA、gcvR、bcp、およびhyfA遺伝子を含む領域の塩基配列を配列番号111に示す。配列番号111に示す塩基配列中、dapA、gcvR、bcp、およびhyfA遺伝子は、それぞれ、858～1736位の配列の相補配列、1882～2454位の配列、2454～2924位の配列、および3177～3794位の配列に相当する。エシェリヒア・コリK5株のDapA、GcvR、Bcp、およびHyfAタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号112～115に示す。

[0172] rpoE遺伝子は、シグマE (σ^E) をコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のrpoE遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、2,707,459～2,708,034位の配列の相補配列に相当する。また、MG1655株のRpoEタンパク質は、GenBank accession NP_417068 (version NP_417068.1 GI:16130498)として登録されている。

[0173] nadB遺伝子は、L-アスパラギン酸オキシダーゼをコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のnadB遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、2,708,442～2,710,064位の配列に相当する。また、MG1655株のNadBタンパク質は、GenBank accession NP_417069 (version NP_417069.1 GI:16130499)として登録されている。

[0174] yfiC遺伝子は、バリンtRNAのA37 (37位のアデニン) の6位のNをメチル化するメチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のyfiC遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、2,710,049～2,710,786位の配列の相補配列に相当する。また、MG1655株のYfiCタンパク質は、GenBank accession NP_417070 (version NP_4170

70.2 GI:90111461)として登録されている。

[0175] srmB遺伝子は、DEAD-box型RNAヘリカーゼをコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のsrmB遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、2,710,918～2,712,252位の配列に相当する。また、MG1655株のSrmBタンパク質は、GenBank accession NP_417071 (version NP_417071.1 GI:16130501)として登録されている。

[0176] エシェリヒア・コリK5株のrpoE、nadB、yfiC、およびsrmB遺伝子を含む領域の塩基配列を配列番号116に示す。配列番号116に示す塩基配列中、rpoE、nadB、yfiC、およびsrmB遺伝子は、それぞれ、355～930位の配列の相補配列、1338～2960位の配列、2945～3682位の配列の相補配列、および3814～5148位の配列に相当する。特に、エシェリヒア・コリK5株のrpoE遺伝子の塩基配列を配列番号174に示す。エシェリヒア・コリK5株のRpoE、NadB、YfiC、およびSrmBタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号117～120に示す。

[0177] g1414およびg1413遺伝子は、機能未知の遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のゲノムにおいて、これらの遺伝子はアノテートされていない。

[0178] エシェリヒア・コリK5株のg1414およびg1413遺伝子を含む領域の塩基配列を配列番号121に示す。配列番号121に示す塩基配列中、g1414およびg1413遺伝子は、それぞれ、28～699位の配列および831～1157位の配列に相当する。エシェリヒア・コリK5株のG1414およびG1413タンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号122および123に示す。

[0179] nuoE、nuoF、およびnuoG遺伝子は、NADHデヒドロゲナーゼIの可溶性フラグメントをコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のnuoE、nuoF、およびnuoG遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、それぞれ、2,399,574～2,400,074位の配列の相補配列、2,398,240

～2,399,577位の配列の相補配列、および2,395,461～2,398,187位の配列の相補配列に相当する。また、MG1655株のNuoE、NuoF、およびNuoGタンパク質は、それぞれ、GenBank accession NP_416788 (version NP_416788.1 GI:16130220)、GenBank accession NP_416787 (version NP_416787.1 GI:16130219)、およびGenBank accession NP_416786 (version NP_416786.4 GI:145698290)として登録されている。

[0180] エシェリヒア・コリK5株のnuoE、nuoF、およびnuoG遺伝子を含む領域の塩基配列を配列番号124に示す。配列番号124に示す塩基配列中、nuoE、nuoF、およびnuoG遺伝子は、それぞれ、796～1296位の配列の相補配列、1293～2630位の配列の相補配列、および2683～5409位の配列の相補配列に相当する。エシェリヒア・コリK5株のNuoE、NuoF、およびNuoGタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号125～127に示す。

[0181] glmZ遺伝子は、低分子RNAをコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のglmZ遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、3,984,455～3,984,626位の配列に相当する。

[0182] hemY、hemX、およびhemD遺伝子は、ヘムとコリンの生合成経路の酵素をコードする遺伝子である。hemY遺伝子は、プロトポルフィリノゲンオキシダーゼをコードする。hemX遺伝子は、ウロポルフィリノゲンIIIメチラーゼと推定されるタンパク質をコードする。hemD遺伝子は、ウロポルフィリノゲンIIIシンターゼをコードする。K-12 MG1655株のhemY、hemX、およびhemD遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、それぞれ、3,984,709～3,985,905位の配列の相補配列、3,985,908～3,987,089位の配列の相補配列、および3,987,111～3,987,851位の配列の相補配列に相当する。また、MG1655株のHemY、HemX、およびHemDタンパク質は、それぞれ、GenBank accession NP_418246 (version NP_418246.1 GI:16131654)、GenBank accession NP_418247 (version NP_418247.1 GI:16131655)、GenBank accession NP_418248 (v

ersion NP_418248.1 GI:16131656)として登録されている。

- [0183] エシェリヒア・コリK5株のglmZ、hemY、hemX、およびhemD遺伝子を含む領域の塩基配列を配列番号128に示す。配列番号128に示す塩基配列中、glmZ、hemY、hemX、およびhemD遺伝子は、それぞれ、357～563位の配列、611～1807位の配列、1810～2991位の配列、および3013～3753位の配列に相当する。エシェリヒア・コリK5株のHemY、HemX、およびHemDタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号129～131に示す。
- [0184] rlmL遺伝子(別名rlmKL)は、23S rRNAのG2445およびG2069をメチル化するメチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のrlmL遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、1,007,067～1,009,175位の配列に相当する。また、MG1655株のRlmLタンパク質は、GenBank accession NP_415468 (version NP_415468.1 GI:16128915)として登録されている。
- [0185] エシェリヒア・コリK5株のrlmL遺伝子を含む領域の塩基配列を配列番号132に示す。配列番号132に示す塩基配列中、rlmL遺伝子は、571～2679位の配列に相当する。エシェリヒア・コリK5株のRlmLタンパク質のアミノ酸配列を、配列番号133に示す。
- [0186] artQ、artM、およびartJ遺伝子は、アルギニンABCトランスポーターのサブユニットをコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のartQ、artM、およびartJ遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、それぞれ、900,757～901,473位の配列の相補配列、900,089～900,757位の配列の相補配列、および899,067～899,798位の配列の相補配列に相当する。また、MG1655株のArtQ、ArtM、およびArtJタンパク質は、それぞれ、GenBank accession NP_415383 (version NP_415383.1 GI:16128830)、GenBank accession NP_415382 (version NP_415382.1 GI:16128829)、およびGenBank accession NP_415381 (version NP_415381.1 GI:16128828)として登録され

ている。

[0187] rlmC遺伝子（別名rumB）は、23S rRNAのU747をメチル化するメチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のrlmC遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、897,741～898,868に相当する。また、MG1655株のRlmCタンパク質は、GenBank accession NP_415380 (version NP_415380.1 GI:16128827)として登録されている。

[0188] ybj0遺伝子は、内膜タンパク質と推定されるタンパク質をコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のybj0遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、897,212～897,700位の配列に相当する。また、MG1655株のYbj0タンパク質は、GenBank accession NP_415379 (version NP_415379.1 GI:16128826)として登録されている。

[0189] エシェリヒア・コリK5株のartQ、artM、artJ、rlmC、およびybj0遺伝子を含む領域の塩基配列を配列番号134に示す。配列番号134に示す塩基配列中、artQ、artM、artJ、rlmC、およびybj0遺伝子は、それぞれ、386～1102位の配列、1102～1770位の配列、2061～2792位の配列、2991～4118位の配列の相補配列、および4159～4647位の配列の相補配列に相当する。エシェリヒア・コリK5株のArtQ、ArtM、ArtJ、RlmC、およびYbj0タンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号135～139に示す。

[0190] yej0遺伝子は、外膜タンパク質をコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のyej0遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、2,284,412～2,286,936位の配列と2,288,136～2,288,202位の配列を結合した配列の相補配列に相当する。MG1655株のyej0遺伝子は、偽遺伝子 (pseudogene) であると考えられる。

[0191] yejM遺伝子は、ハイドロラーゼの1種と推定されるタンパク質をコードす

る遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のyejM遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、2,282,398～2,284,158位の配列に相当する。また、MG1655株のYejMタンパク質は、GenBank accession NP_416693 (version NP_416693.1 GI:16130126)として登録されている。

[0192] yejL遺伝子は、機能未知の遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のyejL遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、2,282,151～2,282,378位の配列に相当する。また、MG1655株のYejLタンパク質は、GenBank accession NP_416692 (version NP_416692.1 GI:16130125)として登録されている。

[0193] エシェリヒア・コリK5株のyej0、yejM、およびyejL遺伝子を含む領域の塩基配列を配列番号140に示す。配列番号140に示す塩基配列中、yej0、yejM、およびyejL遺伝子は、それぞれ、216～2807位の配列、3061～4821位の配列の相補配列、および4841～5068位の配列の相補配列に相当する。エシェリヒア・コリK5株のYej0、YejM、およびYejLタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号141～143に示す。

[0194] rpoS遺伝子は、シグマS (σ^S) をコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のrpoS遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、2,864,581～2,865,573位の配列の相補配列に相当する。また、MG1655株のRpoSタンパク質は、GenBank accession NP_417221 (version NP_417221.1 GI:16130648)として登録されている。

[0195] ygbN遺伝子は、Gntファミリーに属するトランスポーターと推定されるタンパク質をコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のygbN遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、2,863,123～2,864,487位の配列に相当する。また、MG1655株のYgbNタンパク質は、GenB

ank accession NP_417220 (version NP_417220.1 GI:16130647)として登録されている。

[0196] ygbM遺伝子は、機能未知の遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のygbM遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、2,862,258～2,863,034位の配列に相当する。また、MG1655株のYgbMタンパク質は、GenBank accession NP_417219 (version NP_417219.1 GI:16130646)として登録されている。

[0197] ygbL遺伝子は、アルドラーゼの1種と推定されるタンパク質をコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のygbL遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、2,861,615～2,862,253位の配列に相当する。また、MG1655株のYgbLタンパク質は、GenBank accession NP_417218 (version NP_417218.1 GI:16130645)として登録されている。

[0198] エシェリヒア・コリK5株のrpoS、ygbN、ygbM、およびygbL遺伝子を含む領域の塩基配列を配列番号144に示す。配列番号144に示す塩基配列中、rpoS、ygbN、ygbM、およびygbL遺伝子は、それぞれ、318～1310位の配列、1404～2768位の配列の相補配列、2857～3633位の配列の相補配列、および3638～4276位の配列の相補配列に相当する。エシェリヒア・コリK5株のRpoS、YgbN、YgbM、およびYgbLタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号145～148に示す。

[0199] g3798遺伝子は、SOS-response transcriptional repressor (RecA-mediated autopeptidase)と推定されるタンパク質をコードする遺伝子である。g3794遺伝子は、Superinfection exclusion protein Bと推定されるタンパク質をコードする遺伝子である。g3793遺伝子は、restriction inhibitor protein ral (Antirestriction protein)と推定されるタンパク質をコードする遺伝子である。g3797、g3796、g3795、およびg3792遺伝子は、機能未知の遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のゲノムにおいて、これらの遺伝子

はアノテートされていない。

- [0200] エシェリヒア・コリK5株のg3798、g3797、g3796、g3795、g3794、g3793、およびg3792遺伝子を含む領域の塩基配列を配列番号149に示す。配列番号149に示す塩基配列中、g3798、g3797、g3796、g3795、g3794、g3793、およびg3792遺伝子は、それぞれ、615～1268位の配列、1368～2219位の配列、2257～2748位の配列、3021～3203位の配列、3470～4051位の配列の相補配列、4280～4480位の配列、および4520～4717位の配列に相当する。エシェリヒア・コリK5株のG3798、G3797、G3796、G3795、G3794、G3793、およびG3792タンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号150～156に示す。
- [0201] ryjA遺伝子は、低分子RNAをコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のryjA遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、4,275,950～4,276,089位の配列の相補配列に相当する。
- [0202] soxRおよびsoxS遺伝子は、転写制御因子をコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のsoxRおよびsoxS遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、それぞれ、4,275,492～4,275,956位の配列および4,275,083～4,275,406位の配列の相補配列に相当する。また、MG1655株のSoxRおよびSoxSタンパク質は、それぞれ、GenBank accession NP_418487 (version NP_418487.1 GI:16131889)およびGenBank accession NP_418486 (version NP_418486.1 GI:16131888)として登録されている。
- [0203] yjcC遺伝子は、c-di-GMP特異的なホスホジエステラーゼをコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のyjcC遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、4,273,494～4,275,080位の配列に相当する。また、MG1655株のYjcCタンパク質は、GenBank accession NP_418485 (version NP_418485.1 GI:16131887)として登録されている。
- [0204] yjcB遺伝子は、機能未知の遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655

株のyjcB遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、4,272,783～4,273,064位の配列の相補配列に相当する。また、MG1655株のYjcBタンパク質は、GenBank accession NP_418484 (version NP_418484.4 GI:90111681)として登録されている。

[0205] エシェリヒア・コリK5株のryjA、soxR、soxS、yjcC、およびyjcB遺伝子を含む領域の塩基配列を配列番号157に示す。配列番号157に示す塩基配列中、ryjA、soxR、soxS、yjcC、およびyjcB遺伝子は、それぞれ、657～796位の配列、790～1254位の配列の相補配列、1340～1663位の配列、1666～3252位の配列の相補配列、および3682～3963位の配列に相当する。エシェリヒア・コリK5株のSoxR、SoxS、YjcC、およびYjcBタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号158～161に示す。

[0206] efeUおよびefe0遺伝子は、二価鉄イオン輸送担体のコンポーネントをコードする遺伝子である。Escherichia coli K-12 MG1655株のefeUおよびefe0遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、それぞれ、1,080,579～1,081,408位の配列および1,081,466～1,082,593位の配列に相当する。MG1655株のefeU遺伝子は、偽遺伝子 (pseudogene) であると考えられる。また、MG1655株のEfe0タンパク質は、GenBank accession NP_415537 (version NP_415537.1 GI:16128982)として登録されている。

[0207] エシェリヒア・コリK5株のefeUおよびefe0遺伝子を含む領域の塩基配列を配列番号162に示す。配列番号162に示す塩基配列中、efeUおよびefe0遺伝子は、それぞれ、753～1583位の配列および1641～2768位の配列に相当する。エシェリヒア・コリK5株のEfeUおよびEfe0タンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号163および164に示す。

[0208] 本発明の細菌は、例えば、表1～3の遺伝子の内、少なくともrfah遺伝子の発現が増大するよう改変されていてもよく、少なくともrfah遺伝子以外の1またはそれ以上の遺伝子の発現が増大するよう改変されていてもよい。ま

た、本発明の細菌は、例えば、表 1～3 の遺伝子の内、*rfaH* 遺伝子の発現と *rfaH* 遺伝子以外の 1 またはそれ以上の遺伝子の発現とが増大するよう改変されていてもよい。本発明の細菌は、具体的には、例えば、表 1～3 の遺伝子の内、*rfaH* 遺伝子の発現と、*rbsR*、*rbsK*、*rbsB*、*hsrA*、*glgB*、*glgX*、*micF*、*rcsD*、*rcsB*、*ybiX*、*ybiI*、*ybiJ*、*ybiC*、*ybiB*、*nusG*、*pcoR*、*pcoS*、*pcoE*、*yhcN*、*yhcO*、*aaeB*、*aaeA*、*aaeX*、*g1455*、*alpA*、*g1453*、*yrbA*、*m1aB*、*m1aC*、*m1aD*、*m1aE*、*m1aF*、*yrbG*、*norW*、*ybjI*、*ybjJ*、*ybjK*、*rybB*、*yjjY*、*yjtD*、*thrL*、*thrA*、*thrB*、*fruA*、*psuK*、*ytfT*、*yjfF*、*fbp*、*yagU*、*paoA*、*paoB*、*gsiC*、*gsiD*、*yliE*、*irp2*、*irp1*、*bhsA*、および *ycfS* 遺伝子から選択される 1 またはそれ以上の遺伝子の発現とが増大するよう改変されていてもよい。また、本発明の細菌は、例えば、表 1～3 の遺伝子の内、少なくとも *rpoE* 遺伝子の発現が増大するよう改変されていてもよい。発現が増大する表 1～3 の遺伝子の組み合わせは特に制限されない。組み合わせとしては、例えば、後述する実施例に記載の組み合わせが挙げられる。

[0209] 遺伝子の発現を増大させる手法については後述する。例えば、表 1～3 の遺伝子の発現は、配列番号 29、34、37、43、50、54、60、64、72、74、78、84、87、91、95、99、104、107、111、116、121、124、128、132、134、140、144、149、157、または 162 に示す塩基配列を有する DNA 等の、表 1～3 の遺伝子を含む DNA のコピー数を増加させることにより、増大させてよい。また、*irp* 遺伝子にあっては、配列番号 99 に示す塩基配列を有する DNA 等の、*irp* 遺伝子の一部を含む DNA のコピー数を増加させてもよい。上記のようなコピー数を増加させる DNA は、配列番号 29、34、37、43、50、54、60、64、72、74、78、84、87、91、95、99、104、107、111、116、121、124、128、132、134、140、144、149、157、または 162 に示す塩基配列を有する DNA のバリエーションであってもよい。DNA のバリエーションについては、表 1～3 に記載の遺伝子の保存的バリエーションに関する記載を準用で

きる。すなわち、例えば、配列番号29、34、37、43、50、54、60、64、72、74、78、84、87、91、95、99、104、107、111、116、121、124、128、132、134、140、144、149、157、または162に示す塩基配列に対して90%以上の相同性を有するDNAのコピー数を増加させてもよい。

[0210] これらの遺伝子は、これらの遺伝子を保持する株の染色体を鋳型にして、これら公知の遺伝子配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いたPCRにより取得することができる。

[0211] 表1～3の遺伝子は、元の機能が維持されている限り、上記例示した遺伝子のバリエーションであってもよい。同様に、表1～3の遺伝子にコードされるタンパク質は、元の機能が維持されている限り、上記例示したタンパク質のバリエーションであってもよい。そのような元の機能が維持されたバリエーションを「保存的バリエーション」という場合がある。本発明において、上記遺伝子名で特定される遺伝子およびそれに対応する名称で特定されるタンパク質には、それぞれ、上記例示した遺伝子およびタンパク質に加えて、その保存的バリエーションが含まれるものとする。すなわち、例えば、「*rpoE*遺伝子」という用語は、上記例示した*rpoE*遺伝子 (*Escherichia coli* K-12 MG1655株や*Escherichia coli* K5株の*rpoE*遺伝子)に加えて、その保存的バリエーションを包含するものとする。同様に、例えば、「*RpoE*タンパク質」という用語は、上記例示した*RpoE*タンパク質 (*Escherichia coli* K-12 MG1655株や*Escherichia coli* K5株の*RpoE*タンパク質)に加えて、その保存的バリエーションを包含するものとする。保存的バリエーションとしては、例えば、上記例示した遺伝子およびタンパク質のホモログや人為的な改変体が挙げられる。

[0212] 「元の機能が維持されている」とは、遺伝子またはタンパク質のバリエーションが、元の遺伝子またはタンパク質の機能（活性や性質）に対応する機能（活性や性質）を有することをいう。

[0213] すなわち、「元の機能が維持されている」とは、表1～3の遺伝子においては、遺伝子のバリエーションが、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細

菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有することをいう。また、「元の機能が維持されている」とは、表1～3の遺伝子にあっては、遺伝子のバリエントが、元の機能が維持されたタンパク質をコードすることであってもよい。すなわち、表1～3の遺伝子は、上記例示したタンパク質の保存的バリエントをコードするものであってもよい。

[0214] 同様に、「元の機能が維持されている」とは、表1～3の遺伝子にコードされるタンパク質にあっては、タンパク質のバリエントが、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有することをいう。また、「元の機能が維持されている」とは、表1～3の遺伝子にコードされるタンパク質にあっては、タンパク質のバリエントが、上記タンパク質の機能、例えばRpoEタンパク質であればシグマE (σ^E) としての機能、を有することであってもよい。

[0215] 遺伝子またはタンパク質のバリエントが、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するか否かは、同遺伝子または同タンパク質をコードする遺伝子をヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌に導入し、ヘパロサンの生産能が向上するか否かを確認することにより、確認できる。

[0216] 表1～3の遺伝子のホモログは、例えば、上記例示した遺伝子の塩基配列を問い合わせ配列として用いたBLAST検索やFASTA検索によって公開データベースから容易に取得することができる。また、表1～3の遺伝子のホモログは、例えば、細菌等の微生物の染色体を鋳型にして、これら公知の遺伝子配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いたPCRにより取得することができる。

[0217] 表1～3の遺伝子は、元の機能が維持されている限り、上記アミノ酸配列において、1若しくは数個の位置での1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするもので

あってもよい。例えば、コードされるタンパク質は、そのN末端および／またはC末端が、延長または短縮されていてもよい。なお上記「1又は数個」とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造における位置や種類によっても異なるが、具体的には、例えば、1～50個、1～40個、1～30個、好ましくは1～20個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、特に好ましくは1～3個を意味する。

[0218] 上記の1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、または付加は、タンパク質の機能が正常に維持される保存的変異である。保存的変異の代表的なものは、保存的置換である。保存的置換とは、置換部位が芳香族アミノ酸である場合には、Phe、Trp、Tyr間で、置換部位が疎水性アミノ酸である場合には、Leu、Ile、Val間で、極性アミノ酸である場合には、Gln、Asn間で、塩基性アミノ酸である場合には、Lys、Arg、His間で、酸性アミノ酸である場合には、Asp、Glu間で、ヒドロキシル基を持つアミノ酸である場合には、Ser、Thr間でお互いに置換する変異である。保存的置換とみなされる置換としては、具体的には、AlaからSer又はThrへの置換、ArgからGln、His又はLysへの置換、AsnからGlu、Gln、Lys、His又はAspへの置換、AspからAsn、Glu又はGlnへの置換、CysからSer又はAlaへの置換、GlnからAsn、Glu、Lys、His、Asp又はArgへの置換、GluからGly、Asn、Gln、Lys又はAspへの置換、GlyからProへの置換、HisからAsn、Lys、Gln、Arg又はTyrへの置換、IleからLeu、Met、Val又はPheへの置換、LeuからIle、Met、Val又はPheへの置換、LysからAsn、Glu、Gln、His又はArgへの置換、MetからIle、Leu、Val又はPheへの置換、PheからTrp、Tyr、Met、Ile又はLeuへの置換、SerからThr又はAlaへの置換、ThrからSer又はAlaへの置換、TrpからPhe又はTyrへの置換、TyrからHis、Phe又はTrpへの置換、及び、ValからMet、Ile又はLeuへの置換が挙げられる。また、上記のようなアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、または逆位等には、遺伝子が由来する生物の個体差、種の違いに基づく場合などの天然に生じる変異 (mutant又はvariant) によって生じるものも含まれる。

[0219] また、表1～3の遺伝子は、元の機能が維持されている限り、上記アミノ

酸配列全体に対して、80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは97%以上、特に好ましくは99%以上の相同性を有するタンパク質をコードする遺伝子であってもよい。尚、本明細書において、「相同性」(homology)は、「同一性」(identity)を指すことがある。

[0220] また、表1～3の遺伝子は、元の機能が維持されている限り、公知の遺伝子配列から調製され得るプローブ、例えば上記塩基配列の全体または一部に対する相補配列、とストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAであってもよい。「ストリンジントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは97%以上、特に好ましくは99%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1% SDS、好ましくは60℃、0.1×SSC、0.1% SDS、より好ましくは68℃、0.1×SSC、0.1% SDSに相当する塩濃度および温度で、1回、好ましくは2～3回洗浄する条件を挙げることができる。

[0221] 上述の通り、上記ハイブリダイゼーションに用いるプローブは、遺伝子の相補配列の一部であってもよい。そのようなプローブは、公知の遺伝子配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとし、表1～3の遺伝子を含むDNA断片を鋳型とするPCRによって作製することができる。例えば、プローブとしては、300 bp程度の長さのDNA断片を用いることができる。プローブとして300 bp程度の長さのDNA断片を用いる場合には、ハイブリダイゼーションの洗いの条件としては、50℃、2×SSC、0.1% SDSが挙げられる。

[0222] また、宿主によってコドンの縮重性が異なるので、表1～3の遺伝子は、元の機能が維持されている限り、任意のコドンをそれと等価のコドンに置換したものであってもよい。例えば、表1～3の遺伝子は、使用する宿主のコドン使用頻度に応じて最適なコドンを有するように改変されてよい。

[0223] 表1～3の遺伝子のバリエーションは、例えば、部位特異的変異法によって、

コードされるタンパク質の特定の部位のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入または付加を含むように、遺伝子のコード領域を改変することによって取得することができる。また、表1～3の遺伝子のバリエーションは、例えば、変異処理によっても取得され得る。変異処理としては、表1～3の遺伝子の塩基配列を有するDNA分子をヒドロキシルアミン等でインビトロ処理する方法、表1～3の遺伝子を保持する微生物、例えば腸内細菌科に属する微生物を、X線、紫外線、またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)、エチルメタンスルフォネート(EMS)、メチルメタンスルフォネート(MMS)等の変異剤によって処理する方法、エラープローンPCR(Cadwell, R.C. PCR Meth. Appl. 2, 28(1992))、DNA shuffling(Stemmer, W.P. Nature 370, 389(1994))、StEP-PCR(Zhao, H. Nature Biotechnol. 16, 258(1998))などの方法が挙げられる。

[0224] <1-3>遺伝子の発現を増大させる手法

以下に、遺伝子の発現を増大(上昇)させる手法について説明する。

[0225] 遺伝子の発現は、例えば、非改変株と比較して、1.5倍以上、2倍以上、または3倍以上に上昇してよい。また、「遺伝子の発現が上昇する」とは、もともと標的の遺伝子が発現している菌株において同遺伝子の発現量を上昇させることだけでなく、もともと標的の遺伝子が発現していない菌株において、同遺伝子を発現させることを含む。すなわち、「遺伝子の発現が上昇する」とは、例えば、標的の遺伝子を保持しない菌株に同遺伝子を導入し、同遺伝子を発現させることを含む。なお、「遺伝子の発現が上昇する」ことを、「遺伝子の発現が增強される」ともいう。

[0226] 遺伝子の発現の上昇は、例えば、遺伝子のコピー数を増加させることにより達成できる。

[0227] 遺伝子のコピー数の増加は、宿主の染色体へ同遺伝子を導入することにより達成できる。染色体への遺伝子の導入は、例えば、相同組み換えを利用して行うことができる(Miller I, J. H. Experiments in Molecular Genetics, 1972, Cold Spring Harbor Laboratory)。遺伝子は、1コピーのみ導入さ

れてもよく、2コピーまたはそれ以上導入されてもよい。例えば、染色体上に多数のコピーが存在する配列を標的として相同組み換えを行うことで、染色体へ遺伝子の多数のコピーを導入することができる。染色体上に多数のコピーが存在する配列としては、反復DNA配列 (repetitive DNA)、トランスポゾンの両端に存在するインバーテッド・リピートが挙げられる。また、目的物質の生産に不要な遺伝子等の染色体上の適当な配列を標的として相同組み換えを行ってもよい。相同組み換えは、例えば、Redドリブンインテグレーション (Red-driven integration) 法 (Datsenko, K. A, and Wanner, B. L. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 97:6640-6645 (2000)) 等の直鎖状DNAを用いる方法、温度感受性複製起点を含むプラスミドを用いる方法、接合伝達可能なプラスミドを用いる方法、宿主内で機能する複製起点を持たないサイサイドベクターを用いる方法、またはファージを用いたtransduction法により行うことができる。また、遺伝子は、トランスポゾンやMini-Muを用いて染色体上にランダムに導入することもできる (特開平2-109985号公報、US5,882,888、EP805867B1)。

[0228] 染色体上に標的遺伝子が導入されたことの確認は、同遺伝子の全部又は一部と相補的な配列を持つプローブを用いたサザンハイブリダイゼーション、又は同遺伝子の配列に基づいて作成したプライマーを用いたPCR等によって確認できる。

[0229] また、遺伝子のコピー数の増加は、同遺伝子を含むベクターを宿主に導入することによっても達成できる。例えば、標的遺伝子を含むDNA断片を、宿主で機能するベクターと連結して同遺伝子の発現ベクターを構築し、当該発現ベクターで宿主を形質転換することにより、同遺伝子のコピー数を増加させることができる。標的遺伝子を含むDNA断片は、例えば、標的遺伝子を有する微生物のゲノムDNAを鋳型とするPCRにより取得できる。ベクターとしては、宿主の細胞内において自律複製可能なベクターを用いることができる。ベクターは、マルチコピーベクターであるのが好ましい。また、形質転換体を選択するために、ベクターは抗生物質耐性遺伝子などのマーカ

一を有することが好ましい。また、ベクターは、挿入された遺伝子を発現するためのプロモーターやターミネーターを備えていてもよい。ベクターは、例えば、細菌プラスミド由来のベクター、酵母プラスミド由来のベクター、バクテリオファージ由来のベクター、コスミド、またはファージミド等であってよい。エシェリヒア・コリ等の腸内細菌科の細菌において自律複製可能なベクターとして、具体的には、例えば、pUC19、pUC18、pHSG299、pHSG399、pHSG398、pBR322、pSTV29（いずれもタカラバイオ社より入手可）、pACYC184、pMW219（ニッポンジーン社）、pTrc99A（ファルマシア社）、pPROK系ベクター（クロンテック社）、pKK233-2（クロンテック社製）、pET系ベクター（ノバジェン社）、pQE系ベクター（キアゲン社）、広宿主域ベクターRSF1010が挙げられる。

[0230] 遺伝子を導入する場合、遺伝子は、発現可能に本発明の細菌に保持されていればよい。具体的には、遺伝子は、本発明の細菌で機能するプロモーター配列による制御を受けて発現するように導入されていればよい。プロモーターは、宿主由来のプロモーターであってもよく、異種由来のプロモーターであってもよい。プロモーターは、導入する遺伝子の固有のプロモーターであってもよく、他の遺伝子のプロモーターであってもよい。プロモーターとしては、例えば、後述するような、より強力なプロモーターを利用してもよい。

[0231] 遺伝子の下流には、転写終結用のターミネーターを配置することができる。ターミネーターは、本発明の細菌において機能するものであれば特に制限されない。ターミネーターは、宿主由来のターミネーターであってもよく、異種由来のターミネーターであってもよい。ターミネーターは、導入する遺伝子の固有のターミネーターであってもよく、他の遺伝子のターミネーターであってもよい。ターミネーターとして、具体的には、例えば、T7ターミネーター、T4ターミネーター、fdファージターミネーター、tetターミネーター、およびtrpAターミネーターが挙げられる。

[0232] 各種微生物において利用可能なベクター、プロモーター、ターミネーター

に関しては、例えば「微生物学基礎講座 8 遺伝子工学、共立出版、1987年」に詳細に記載されており、それらを利用することが可能である。

[0233] また、2またはそれ以上の遺伝子を導入する場合、各遺伝子が、発現可能に本発明の細菌に保持されていればよい。例えば、各遺伝子は、全てが単一の発現ベクター上に保持されていてもよく、全てが染色体上に保持されていてもよい。また、各遺伝子は、複数の発現ベクター上に別々に保持されていてもよく、単一または複数の発現ベクター上と染色体上とに別々に保持されていてもよい。また、2またはそれ以上の遺伝子でオペロンを構成して導入してもよい。「2またはそれ以上の遺伝子を導入する場合」としては、例えば、2またはそれ以上の酵素をそれぞれコードする遺伝子を導入する場合、単一の酵素を構成する2またはそれ以上のサブユニットをそれぞれコードする遺伝子を導入する場合、およびそれらの組み合わせが挙げられる。

[0234] 導入される遺伝子は、宿主で機能するタンパク質をコードするものであれば特に制限されない。導入される遺伝子は、宿主由来の遺伝子であってもよく、異種由来の遺伝子であってもよい。導入される遺伝子は、例えば、同遺伝子の塩基配列に基づいて設計したプライマーを用い、同遺伝子を有する生物のゲノムDNAや同遺伝子を搭載するプラスミド等を鋳型として、PCRにより取得することができる。また、導入される遺伝子は、例えば、同遺伝子の塩基配列に基づいて全合成してもよい (Gene, 60(1), 115-127 (1987))。

[0235] なお、タンパク質が複数のサブユニットからなる複合体として機能する場合、結果としてタンパク質の活性が増大する限り、それら複数のサブユニットの全てを改変してもよく、一部のみを改変してもよい。すなわち、例えば、遺伝子の発現を上昇させることによりタンパク質の活性を増大させる場合、それらのサブユニットをコードする複数の遺伝子の全ての発現を増強してもよく、一部の発現のみを増強してもよい。通常は、それらのサブユニットをコードする複数の遺伝子の全ての発現を増強するのが好ましい。また、複合体を構成する各サブユニットは、複合体が目的のタンパク質の機能を有する限り、1種の生物由来であってもよく、2種またはそれ以上の異なる生物

由来であってもよい。すなわち、例えば、複数のサブユニットをコードする、同一の生物由来の遺伝子を宿主に導入してもよく、それぞれ異なる生物由来の遺伝子を宿主に導入してもよい。

[0236] また、遺伝子の発現の上昇は、遺伝子の転写効率を向上させることにより達成できる。遺伝子の転写効率の向上は、例えば、染色体上の遺伝子のプロモーターをより強力なプロモーターに置換することにより達成できる。「より強力なプロモーター」とは、遺伝子の転写が、もともと存在している野生型のプロモーターよりも向上するプロモーターを意味する。より強力なプロモーターとしては、例えば、公知の高発現プロモーターであるT7プロモーター、trpプロモーター、lacプロモーター、thrプロモーター、tacプロモーター、trcプロモーター、tetプロモーター、araBADプロモーター、rpoHプロモーター、PRプロモーター、およびPLプロモーターが挙げられる。また、より強力なプロモーターとしては、各種レポーター遺伝子を用いることにより、在来プロモーターの高活性型のものを取得してもよい。例えば、プロモーター領域内の-35、-10領域をコンセンサス配列に近づけることにより、プロモーターの活性を高めることができる（国際公開第00/18935号）。高活性型プロモーターとしては、各種tac様プロモーター（Katashkina JI et al, Russian Federation Patent application 2006134574）やpnlp8プロモーター（W02010/027045）が挙げられる。プロモーターの強度の評価法および強力なプロモーターの例は、Goldsteinらの論文（Prokaryotic promoters in biotechnology, Biotechnol. Annu. Rev., 1, 105-128 (1995)）等に記載されている。

[0237] また、遺伝子の発現の上昇は、遺伝子の翻訳効率を向上させることにより達成できる。遺伝子の翻訳効率の向上は、例えば、染色体上の遺伝子のシャインダルガノ（SD）配列（リボソーム結合部位（RBS）ともいう）をより強力なSD配列に置換することにより達成できる。「より強力なSD配列」とは、mRNAの翻訳が、もともと存在している野生型のSD配列よりも向上するSD配列を意味する。より強力なSD配列としては、例えば、ファ

ージT7由来の遺伝子10のRBSが挙げられる(Olins P. O. et al, Gene, 1988, 73, 227-235)。さらに、RBSと開始コドンとの間のスペーサー領域、特に開始コドンのすぐ上流の配列(5'-UTR)における数個のヌクレオチドの置換、あるいは挿入、あるいは欠失がmRNAの安定性および翻訳効率に非常に影響を及ぼすことが知られており、これらを改変することによっても遺伝子の翻訳効率を向上させることができる。

[0238] 本発明においては、プロモーター、SD配列、およびRBSと開始コドンとの間のスペーサー領域等の遺伝子の発現に影響する部位を総称して「発現調節領域」ともいう。発現調節領域は、プロモーター検索ベクターやGENETYX等の遺伝子解析ソフトを用いて決定することができる。これら発現調節領域の改変は、例えば、温度感受性ベクターを用いた方法や、Redドリブンインテグレーション法(WO2005/010175)により行うことができる。

[0239] 遺伝子の翻訳効率の向上は、例えば、コドンの改変によっても達成できる。エシェリヒア・コリ等において、mRNA分子の集団内に見出される61種のアミノ酸コドン間には明らかなコドンの偏りが存在し、あるtRNAの存在量は、対応するコドンの使用頻度と直接比例するようである(Kane, J.F., Curr. Opin. Biotechnol., 6(5), 494-500 (1995))。すなわち、過剰のレアコドンを含むmRNAが大量に存在すると翻訳の問題が生じうる。近年の研究によれば、特に、AGG/AGA、CUA、AUA、CGA、又はCCCコドンのクラスターが、合成されたタンパク質の量および質の両方を低下させ得ることが示唆されている。このような問題は、特に異種遺伝子の発現の際に生じうる。よって、遺伝子の異種発現を行う場合等には、遺伝子中に存在するレアコドンを、より高頻度で利用される同義コドンに置き換えることにより、遺伝子の翻訳効率を向上させることができる。コドンの置換は、例えば、DNAの目的の部位に目的の変異を導入する部位特異的変異法により行うことができる。部位特異的変異法としては、PCRを用いる方法(Higuchi, R., 61, in PCR technology, Erlich, H. A. Eds., Stockton press (1989); Carter, P., Meth. in Enzymol., 154, 382 (1987))や、ファージを

用いる方法 (Kramer, W. and Frits, H. J., Meth. in Enzymol., 154, 350 (1987); Kunkel, T. A. et al., Meth. in Enzymol., 154, 367 (1987)) が挙げられる。また、コドンが置換された遺伝子断片を全合成してもよい。種々の生物におけるコドンの使用頻度は、「コドン使用データベース」 (<http://www.kazusa.or.jp/codon>; Nakamura, Y. et al, Nucl. Acids Res., 28, 292 (2000)) に開示されている。

[0240] また、遺伝子の発現の上昇は、遺伝子の発現を上昇させるようなレギュレーターを増幅すること、または、遺伝子の発現を低下させるようなレギュレーターを欠失または弱化させることによっても達成できる。

[0241] 上記のような遺伝子の発現を上昇させる手法は、単独で用いてもよく、任意の組み合わせで用いてもよい。

[0242] 形質転換の方法は特に限定されず、従来知られた方法を用いることができる。例えば、エシェリヒア・コリ K-12について報告されているような、受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法 (Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol. 1970, 53, 159-162) や、バチルス・ズブチリスについて報告されているような、増殖段階の細胞からコンピテントセルを調製してDNAを導入する方法 (Duncan, C. H., Wilson, G. A. and Young, F. E., 1997. Gene 1: 153-167) を用いることができる。あるいは、バチルス・ズブチリス、放線菌類、及び酵母について知られているような、DNA受容菌の細胞を、組換えDNAを容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストの状態にして組換えDNAをDNA受容菌に導入する方法 (Chang, S. and Choen, S. N., 1979. Mol. Gen. Genet. 168: 111-115; Bibb, M. J., Ward, J. M. and Hopwood, O. A. 1978. Nature 274: 398-400; Hinnen, A., Hicks, J. B. and Fink, G. R. 1978. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1929-1933) も応用できる。あるいは、コリネ型細菌について報告されているような、電気パルス法 (特開平2-207791) を利用することもできる。

[0243] 遺伝子の発現が上昇したことは、同遺伝子の転写量が上昇したことを確認することや、同遺伝子から発現するタンパク質の量が上昇したことを確認す

ることにより確認できる。また、遺伝子の発現が上昇したことは、同遺伝子から発現するタンパク質の活性が増大したことを確認することにより確認できる。

[0244] 遺伝子の転写量が上昇したことの確認は、同遺伝子から転写されるmRNAの量を野生株または親株等の非改変株と比較することによって行うことができる。mRNAの量を評価する方法としてはノーザンハイブリダイゼーション、RT-PCR等が挙げられる(Sambrook, J., et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual/Third Edition, Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor (USA), 2001)。mRNAの量は、非改変株と比較して、例えば、1.5倍以上、2倍以上、または3倍以上に上昇してよい。

[0245] タンパク質の量が上昇したことの確認は、抗体を用いてウェスタンブロットによって行うことができる(Molecular cloning(Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor (USA), 2001))。タンパク質の量は、非改変株と比較して、例えば、1.5倍以上、2倍以上、または3倍以上に上昇してよい。

[0246] タンパク質の活性が増大したことは、同タンパク質の活性を測定することで確認できる。タンパク質の活性は、非改変株と比較して、例えば、1.5倍以上、2倍以上、または3倍以上に上昇してよい。

[0247] 上記した遺伝子の発現を増大させる手法は、任意の遺伝子、例えば表1～3の遺伝子やヘパロサン生産に関与するタンパク質をコードする遺伝子、の発現増強に利用できる。

[0248] <2>ヘパロサンの製造法

本発明のヘパロサンの製造法は、本発明の細菌を培地で培養してヘパロサンを該培地中に生成蓄積すること、および該培地よりヘパロサンを採取することを含む、ヘパロサンの製造法である。

[0249] 使用する培地は、本発明の細菌が増殖でき、ヘパロサンが生成蓄積される限り、特に制限されない。培地としては、例えば、細菌の培養に用いられる通常の培地を用いることができる。培地として、具体的には、例えば、LB培

地（Luria-Bertani培地；1リットルあたりBacto-tryptone 10.0 g、Bacto-yeast extract 5.0 g、及びNaCl 5.0 gを含む）が挙げられるが、これらに限定されない。培地としては、例えば、炭素源、窒素源、リン酸源、硫黄源、その他の各種有機成分や無機成分から選択される成分を必要に応じて含有する培地を用いることができる。培地成分の種類や濃度は、当業者が適宜設定してよい。

[0250] 炭素源は、本発明の細菌が資化してヘパロサンを生成し得るものであれば、特に限定されない。炭素源として、具体的には、例えば、グルコース、フルクトース、スクロース、ラクトース、ガラクトース、キシロース、アラビノース、廃糖蜜、澱粉加水分解物、バイオマスの加水分解物等の糖類、酢酸、フマル酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸等の有機酸類、グリセロール、粗グリセロール、エタノール等のアルコール類、脂肪酸類が挙げられる。炭素源としては、1種の炭素源を用いてもよく、2種またはそれ以上の炭素源を組み合わせ用いてもよい。

[0251] 窒素源として、具体的には、例えば、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アンモニウム塩、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、大豆タンパク質分解物等の有機窒素源、アンモニア、ウレアが挙げられる。窒素源としては、1種の窒素源を用いてもよく、2種またはそれ以上の窒素源を組み合わせ用いてもよい。

[0252] リン酸源として、具体的には、例えば、リン酸2水素カリウム、リン酸水素2カリウム等のリン酸塩、ピロリン酸等のリン酸ポリマーが挙げられる。リン酸源としては、1種のリン酸源を用いてもよく、2種またはそれ以上のリン酸源を組み合わせ用いてもよい。

[0253] 硫黄源として、具体的には、例えば、硫酸塩、チオ硫酸塩、亜硫酸塩等の無機硫黄化合物、システイン、シスチン、グルタチオン等の含硫アミノ酸が挙げられる。硫黄源としては、1種の硫黄源を用いてもよく、2種またはそれ以上の硫黄源を組み合わせ用いてもよい。

[0254] その他の各種有機成分や無機成分として、具体的には、例えば、塩化ナト

リウム、塩化カリウム等の無機塩類；鉄、マンガン、マグネシウム、カルシウム等の微量元素類；ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB6、ニコチン酸、ニコチン酸アミド、ビタミンB12等のビタミン類；アミノ酸類；核酸類；これらを含むペプトン、カザミノ酸、酵母エキス、大豆タンパク質分解物等の有機成分が挙げられる。その他の各種有機成分や無機成分としては、1種の成分を用いてもよく、2種またはそれ以上の成分を組み合わせ用いてもよい。

[0255] また、生育にアミノ酸などを要求する栄養要求性変異株を使用する場合には、培地に要求される栄養素を補添することが好ましい。また、抗生物質耐性遺伝子を搭載するベクターを用いて遺伝子を導入した際は、培地に対応する抗生物質を添加するのが好ましい。

[0256] 培養条件は、本発明の細菌が増殖でき、ヘパロサンが生成蓄積される限り、特に制限されない。培養は、例えば、細菌の培養に用いられる通常の方法で行うことができる。培養条件は、当業者が適宜設定してよい。

[0257] 培養は、例えば、液体培地を用いて、通気培養または振盪培養により、好氣的に行うことができる。培養温度は、例えば、30～37℃であってよい。培養期間は、例えば、16～72時間であってよい。培養は、回分培養 (batch culture)、流加培養 (Fed-batch culture)、連続培養 (continuous culture)、またはそれらの組み合わせにより実施することができる。また、培養は、前培養と本培養とに分けて行われてもよい。前培養は、例えば、平板培地や液体培地を用いて行ってよい。

[0258] 上記のようにして本発明の細菌を培養することにより、培地中にヘパロサンが蓄積する。

[0259] 培養液からヘパロサンを回収する方法は、ヘパロサンが回収されうる限り、特に制限されない。培養液からヘパロサンを回収する方法としては、例えば、実施例に記載する方法が挙げられる。具体的には、例えば、培養液から培養上清を分離し、次いで、エタノール沈殿によって上清中のヘパロサンを沈降させることができる。添加するエタノールの量は、例えば、上清液量の

2. 5～3. 5 倍量であってよい。ヘパロサンの沈降には、エタノールに限られず、水と任意に混和する有機溶媒を使用することができる。そのような有機溶媒としては、エタノールに加えて、メタノール、*n*-プロパノール、イソプロパノール、*n*-ブタノール、*t*-ブタノール、*sec*-ブタノール、プロピレングリコール、アセトニトリル、アセトン、DMF、DMSO、*N*-メチルピロリドン、ピリジン、1, 2-ジメトキシエタン、1, 4-ジオキサン、THFが挙げられる。沈殿したヘパロサンは、例えば、元の上清液量の2倍量の水で溶解させることができる。回収されるヘパロサンは、ヘパロサン以外に、細菌菌体、培地成分、水分、及び細菌の代謝副産物等の成分を含んでいてもよい。ヘパロサンは、所望の程度に精製されていてよい。ヘパロサンの純度は、例えば、30% (w/w) 以上、50% (w/w) 以上、70% (w/w) 以上、80% (w/w) 以上、90% (w/w) 以上、または95% (w/w) 以上であってよい。

[0260] ヘパロサンの検出および定量は、公知の手法により行うことができる。具体的には、例えば、ヘパロサンは、カルバゾール法にて検出および定量することができる。カルバゾール法は、ウロン酸の定量方法として広く用いられる手法であり、ヘパロサンを硫酸の存在下でカルバゾールと熱反応させ、生成した呈色物質による530 nmの吸収を測定することにより、ヘパロサンを検出及び定量することができる (Bitter T. and Muir H.M., (1962) "A modified uronic acid carbazole reaction," *Analytical Biochemistry*, 4(4): 330 ? 334)。また、例えば、ヘパロサンをヘパロサン分解酵素であるヘパリナーゼIIIで処理し、二糖組成分析を行うことによって、ヘパロサンを検出及び定量することができる。

[0261] <3>ヘパリンの製造法

本発明の細菌により生産されるヘパロサンを利用して、ヘパリンを製造することができる。すなわち、本発明のヘパリンの製造法は、本発明の細菌を培地で培養してヘパロサンを該培地中に生成蓄積すること、該ヘパロサンを化学的および／または酵素的に処理してヘパリンを生産すること、および該

ヘパリンを回収することを含む、ヘパリンの製造法である。ヘパリンは抗凝固活性を有し、医薬品の成分として利用できる。

[0262] ヘパロサンからのヘパリンの製造法は既に報告されている。具体的には、例えば、ヘパロサンを出発物質として、(1) N-脱アセチル化、(2) N-硫酸化、(3) C5エピマー化、(4) 2-O-硫酸化、(5) 6-O-硫酸化、および(6) 3-O-硫酸化の工程を経ることにより、抗凝固活性を有するヘパリンを生成できる (Zhang Z. et al., (2008) "Solution Structures of Chemoenzymatically Synthesized Heparin and Its Precursors." J Am Chem Soc., 130(39): 12998-13007.)。ヘパリンの製造法は、さらに、低分子化の工程を含んでいてもよい。このようなヘパロサンからヘパリンを製造する工程を総称して「ヘパリン生成処理」ともいう。ヘパリン生成処理における各工程の実施順序は、所望の性質を有するヘパリンが得られる限り、特に制限されない。

[0263] ヘパロサンは、培地に含まれたままヘパリン生成処理に供してもよく、培地から回収してからヘパリン生成処理に供してもよい。また、ヘパロサンは、適宜前処理を行ってからヘパリン生成処理に供してもよい。前処理としては、例えば、精製、希釈、濃縮、乾燥、溶解等が挙げられる。これらの前処理は、適宜組み合わせて行ってもよい。例えば、ヘパロサンを含有する培養液をそのまま、あるいは所望の程度に精製して、ヘパリン生成処理に供してもよい。

[0264] N-脱アセチル化は、例えば、水酸化ナトリウムを利用して化学的に行うことができる。反応条件は、当業者が適宜設定することができる。例えば、既報 (Kuberan B. et al., (2003) "Chemoenzymatic Synthesis of Classical and Non-classical Anticoagulant Heparan Sulfate Polysaccharides." J Biol Chem., 278(52): 52613-52621.) の条件を参照することができる。

[0265] N-硫酸化は、例えば、三酸化硫黄・トリメチルアミン錯体を利用して化学的に行うことができる。反応条件は、当業者が適宜設定することができる。例えば、既報 (Kuberan B. et al., (2003) "Chemoenzymatic Synthesis of

Classical and Non-classical Anticoagulant Heparan Sulfate Polysaccharides.” J Biol Chem., 278(52): 52613-52621.) の条件を参照することができる。

[0266] C5エピマー化は、例えば、C5-エピメラーゼを利用して酵素的に行うことができる。C5-エピメラーゼは、グルクロン酸 (GlcUA) 残基のイズロン酸 (IdoA) 残基への異性化を触媒できるものであれば特に制限されない。また、C5エピマー化と、N-脱アセチル化および／または0-硫酸化の順序によっては、適切な基質特異性を有するC5-エピメラーゼを選択して用いてもよい。C5-エピメラーゼは、動物、植物、微生物等、いずれの由来であってもよい。C5-エピメラーゼとしては、例えば、ヒトのC5-エピメラーゼを利用することができる。反応条件は、当業者が適宜設定することができる。例えば、既報 (Chen J, et al., "Enzymatic redesigning of biologically active heparan sulfate." J Biol Chem. 2005 Dec 30;280(52):42817-25.) の条件を参照することができる。

[0267] 2-0-硫酸化は、例えば、2-0-硫酸化酵素 (2-OST) を利用して酵素的に行うことができる。2-OSTは、IdoA残基の0-2位の硫酸化を触媒できるものであれば特に制限されない。また、2-0-硫酸化と、N-脱アセチル化、C5エピマー化、6-0-硫酸化、および／または3-0-硫酸化の順序によっては、適切な基質特異性を有する2-OSTを選択して用いてもよい。2-OSTは、動物、植物、微生物等、いずれの由来であってもよい。2-OSTとしては、例えば、ハムスターの2-OSTを利用することができる。反応条件は、当業者が適宜設定することができる。例えば、既報 (Chen J, et al., "Enzymatic redesigning of biologically active heparan sulfate." J Biol Chem. 2005 Dec 30;280(52):42817-25.) の条件を参照することができる。

[0268] 6-0-硫酸化は、例えば、6-0-硫酸化酵素 (6-OST) を利用して酵素的に行うことができる。6-OSTは、N-硫酸化グルコサミン (GlcNS) 残基の0-6位の硫酸化を触媒できるものであれば特に制限されない。また、6-0-硫酸化と、N-脱アセチル化、C5エピマー化、2-0-硫酸化、および／または3-0-硫酸化の順序

によっては、適切な基質特異性を有する6-OSTを選択して用いてもよい。6-OSTは、動物、植物、微生物等、いずれの由来であってもよい。6-OSTとしては、例えば、ハムスターの6-OST-1やマウスの6-OST-3を利用することができる。反応条件は、当業者が適宜設定することができる。例えば、既報 (Chen J, et al., "Enzymatic redesigning of biologically active heparan sulfate." J Biol Chem. 2005 Dec 30;280(52):42817-25.) の条件を参照することができる。

[0269] 3-O-硫酸化は、例えば、3-O-硫酸化酵素 (3-OST) を利用して酵素的に行うことができる。3-OSTは、N-硫酸化・6-O-硫酸化グルコサミン残基のO-3位の硫酸化を触媒できるものであれば特に制限されない。また、3-O-硫酸化と、N-脱アセチル化、C5エピマー化、2-O-硫酸化、および／または6-O-硫酸化の順序によっては、適切な基質特異性を有する3-OSTを選択して用いてもよい。3-OSTは、動物、植物、微生物等、いずれの由来であってもよい。3-OSTとしては、例えば、マウスの3-OST-1を利用することができる。反応条件は、当業者が適宜設定することができる。例えば、既報 (Chen J, et al., "Enzymatic redesigning of biologically active heparan sulfate." J Biol Chem. 2005 Dec 30;280(52):42817-25.) の条件を参照することができる。

[0270] 低分子化は、例えば、亜硫酸を用いて、または光分解法により、行うことができる。低分子化の程度は特に制限されない。低分子化は、例えば、分子量1000～35000 Daのヘパリンが製造されるように実施されてもよい。

[0271] 生成したヘパリンの回収は、化合物の分離精製に用いられる公知の手法により行うことができる。そのような手法としては、例えば、イオン交換樹脂法、膜処理法、沈殿法、および晶析法が挙げられる。これらの手法は適宜組み合わせる用いることができる。回収されるヘパリンは、ヘパリン以外に、ヘパリン生成処理に用いられた成分や水分等の成分を含んでいてもよい。ヘパリンは、所望の程度に精製されていてよい。ヘパリンの純度は、例えば、30% (w/w) 以上、50% (w/w) 以上、70% (w/w) 以上、80% (w/w) 以上、90% (w/w) 以上、または95% (w/w) 以上であってよい。

[0272] 得られたヘパリンは、さらに分画して、低分子ヘパリンを取得することもできる。低分子ヘパリンとは、例えば、分子量1000～10000 Da（平均分子量4000-6000 Da）の画分をいう。低分子ヘパリンは、未分画ヘパリンと比較して、出血の副作用が少ないという利点を有する。

実施例

[0273] 以下、実施例をもとに、本発明をより具体的に説明する。

[0274] 実施例 1：エシェリヒア・コリ BL21(DE3)株からのヘパロサン生産株構築

(1-1) エシェリヒア・コリ K5株のkfiABCD遺伝子の発現プラスミドの構築

エシェリヒア・コリ K5 (ATCC 23506) よりkfiABCD遺伝子 (kfiABCDオペロン) をpVK9ベクター (配列番号1、米国特許出願公開20050196846号) にクローニングし、kfiABCD遺伝子の発現プラスミドpVK9-kfiABCDを構築した。

[0275] 発現プラスミドの構築の詳細を以下に示す。エシェリヒア・コリ K5の染色体DNAをテンプレートとして、プライマーKfiABCD-kpnF (配列番号2) 及びプライマーKfiABCD-xbaR (配列番号3) を用いたPCRによって、kfiABCD遺伝子及びその上流約450 bpを含むDNA断片を取得した。PCRにはPrimeStarポリメラーゼ (TaKaRa社) を用い、プロトコールに記載の反応組成で行った。PCRサイクルは次の通りである。94℃ 5分の後、98℃ 5秒、55℃ 10秒、72℃ 8分を30サイクル、最後に4℃保温。また、pVK9をテンプレートDNAとし、配列番号4及び配列番号5のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いたPCRによって、pVK9のDNA断片を得た。PCRにはPrimeStarポリメラーゼを用い、プロトコールに記載の反応組成で行った。PCRサイクルは次の通りである。94℃ 5分の後、98℃ 5秒、55℃ 10秒、72℃ 6分を30サイクル、最後に4℃保温。得られた両DNA断片をIn-Fusion (登録商標) HDクローニングキット (クロンテック社製) を用いて連結し、kfiABCD遺伝子の発現プラスミドpVK9-kfiABCDを構築した。クローニングされたkfiABCD遺伝子及びその上流約450 bpを含む塩基配列を配列番号24に示す。

[0276] (1-2) エシェリヒア・コリ BL21(DE3)株のkfiABCD遺伝子発現株の構築

kfiABCD遺伝子の発現プラスミドpVK9-kfiABCDをエシェリヒア・コリBL21(DE3)株（ライフテクノロジーズ社）へエレクトロポレーション（Cell; 80 μ L, 200 Ω , 25 μ F, 1.8 kV、キュベット ; 0.1 mL）により導入し、エシェリヒア・コリBL21(DE3)/pVK9-kfiABCD株を得た。この株を25 μ g/mL カナマイシン添加LB寒天培地に塗り広げ、37°Cで一晩前培養を行った。その後、プレート上の菌体を掻き取り、試験管に2 mL張りこんだ生産培地中に植菌した。37°Cにて40時間振とう培養を行い、培地中のグリセロールが完全に消費された時点で培養を終了した。

[0277] 生産培地の組成を以下に示す。

〔生産培地〕（各成分の濃度は最終濃度）

成分 1 :

グリセロール	10 g/L
--------	--------

成分 2 :

MOPS (3-N-morpholino-propanesulphonic acid)	41.9 g/L
---	----------

成分 3 :

トリプトン	8.8 g/L
-------	---------

イーストエキストラクト	4.4 g/L
-------------	---------

塩化ナトリウム	8.8 g/L
---------	---------

成分1および成分3は、それぞれ120°C、20分のオートクレーブ滅菌し、成分2はフィルター滅菌した。室温に冷却後、3者を混合した。

[0278] (1 - 3) カルバゾール法による多糖の定量

カルバゾール法 (Bitter, T. and Murir H. M., Anal. Biochem. 1962;4:3 30-334) により、生成した多糖の定量を行った。手順を以下に示す。

[0279] 培養液（発酵ブロス）から遠心分離により培養上清を回収した。150 μ Lの培養上清に500 μ Lの100% エタノールを加え、遠心分離によって多糖成分を沈降させた。得られた沈殿を風乾させ、300 μ Lの0.2 N 水酸化ナトリウム水溶液で沈殿を溶解した。得られたサンプル（溶解物）30 μ Lを、冷却した0.025 M 四ホウ素酸・硫酸水溶液150 μ Lに静かに加え、100°Cで10分加熱した。室温

に冷却後、0.025% カルバゾール溶液（カルバゾール 0.125 gを100% エタノール 100 mLで溶解したもの）30 μ Lを添加した。100°Cで15分加熱した後、室温まで冷却し、吸光度530 nmを測定した。D-グルクロン酸を標準曲線として定量した結果、サンプル（溶解物）に含まれる多糖濃度はグルクロン酸濃度に換算して140.5 mg/Lと算出された。

[0280] 実施例 2：生成多糖の構造解析

（2－1）核磁気共鳴（NMR）スペクトル解析

実施例 1 で得られた発酵ブ罗斯を遠心除菌し、上清を0.45 μ mのMF膜でろ過した。得られたろ過液31 gを100 KDaのUF膜（Amicon-15K 5000 rpm）を用いて1.1 gまで濃縮した。濃縮液を更に40 mLの水で2回洗浄した。洗浄済み濃縮液をエバポレーターで減圧濃縮し、その残渣液に重水600 μ Lを添加して溶解液を調製後、 ^1H -NMR測定を行った。

[0281] 分析条件を以下に示す。

- （A）装置名 Bruker製 AVANCE400 ^1H ; 400 MHz
- （B）溶媒 重水
- （C）温度 室温
- （D）測定回数 16回

[0282] 結果、 ^1H -NMR (D_2O) σ : 1.9 (N-アセチル基のメチルプロトン)、3.3-4.5 (C2からC6のメチレン及びメチンプロトン)、5.3 (C1のメチンプロトン) のスペクトルが観察された。これらのスペクトルは、Iduron製ヘパロサン（ロット番号：B.N.4）の ^1H -NMRスペクトルと同一であった。

[0283] （2－2）液体クロマトグラフ質量分析（LC-MS）による二糖組成分析

実施例1で得られた発酵ブ罗斯を遠心除菌し、上清を0.45 μ mのMF膜でろ過した。得られたろ過液40 mLを100 KDaのUF膜（Amicon-15K 5000 rpm）を用いて4 mLまで濃縮した。濃縮液を更に40 mLの水で2回洗浄した。洗浄済み濃縮液50 μ Lに、Tri-buffer (200 mM Tri-HCl、1 M NaCl、15 mM CaCl_2 ; 35%塩酸でpH7 (25°C) に調整) 10 μ L、ヘパリナーゼIII 10 μ L (0.005 unit/mL、Iduron製)、および水30 μ Lを添加し、37°Cで16時間酵素処理を行った。得ら

れた酵素処理液に900 μ Lの水を添加し、LC-MS分析を行った。

[0284] 分析条件を以下に示す。

- (A) 装置名 島津製作所製 LC-MS 2010
- (B) カラム UG80 (SCX 資生堂) 2.0 mm * 250 mm 粒子径 : 5 μ m
- (C) 移動相 $\text{CH}_3\text{CN}/10$ mM ギ酸=8/2
- (D) 流速 0.2 mL/min
- (E) カラム温度 40°C
- (F) 注入量 10 μ L
- (G) UV (PDA) 200-600 nm
- (H) MS (ESI) 100-2000 (ポジ、ネガ)

[0285] 結果、リテンションタイム : 6 minに、 $[m/z]=362(M+H-H_2O)$, 380 (M+H), 418 (M+K) のフラグメントイオンを検出した。酵素処理液のリテンションタイム及びフラグメントパターンは、ヘパリンおよびヘパラン硫酸のヘパリナーゼ消化産物である $\Delta\text{GlcUA-GlcNAc}$ 標品 (Heparin disaccharide IV-A sodium salt, Sigma-Aldrich社) のリテンションタイム及びフラグメントパターンと一致した。 $\Delta\text{GlcUA-GlcNAc}$ 標品の構造式を下記式 (I) に示した。

[0286] [化1]



[0287] 上記のNMR及びLC-MSの結果から、BL21(DE3)/pVK9-kfiABCD株の培養ブロスより得られた高分子成分は目的とするヘパロサンであると同定した。従って、カルバゾール法にて定量されるヘパロサン濃度として、グルクロン酸濃度に係数2.067を乗算した値を用いることとした。

[0288] (2-3) ゲルろ過クロマトグラフィー (GPC) 分析

実施例1で得られた発酵ブロスを遠心除菌し、上清を0.45 μ mのMF膜でろ過した。得られたろ過液31 gを100 KDaのUF膜 (Amicon-15K 5000 rpm) を用い

て1.1 gまで濃縮した。濃縮液を更に40 mLの水で2回洗浄した。洗浄済み濃縮液のGPC測定を行った。

[0289] 分析条件を以下に示す。

- (A) 装置名 島津製HPLC
- (B) カラム Asahipak GS520HQ 7.5 mm * 300 mm
- (C) 移動相 100 mM KH₂PO₄
- (D) 流速 0.6 mL/min
- (E) カラム温度 40℃
- (F) 注入量 20 μ L
- (G) UV 200 nm
- (H) 分子量標準試料 プルラン（昭和電工製 P-82）

[0290] 結果、リテンションタイム（ピークトップ）：8.3 min、数平均分子量（Mn）：240,000、重量平均分子量（Mw）：320,000、Mw/Mn=1.3であることが確認された。

[0291] 実施例3：ヘパロサン生産能を向上させる因子のスクリーニング

本実施例では、ヘパロサン生産株にエシェリヒア・コリK5株のゲノムライブラリーを導入し、ヘパロサン生産能を向上させる因子のスクリーニングを行った。

[0292] (3-1) エシェリヒア・コリBL21(DE3)-Ptac-rfaH/pVK9-kfiABCD株の構築

ゲノムライブラリーを導入するためのヘパロサン生産株として、kfiABCD遺伝子が導入され、且つ、rfaH遺伝子の発現が増強されたエシェリヒア・コリBL21(DE3)-Ptac-rfaH/pVK9-kfiABCD株を、以下の手順で構築した。

[0293] rfaH遺伝子の発現増強株は、染色体上のrfaH遺伝子の天然のプロモーター領域を強力なtacプロモーター（Amann E. et al., (1983) “Vectors bearing a hybrid trp-lac promoter useful for regulated expression of cloned genes in Escherichia coli.” Gene., 25(2-3):167-78.）へ置換することによって取得した。tacプロモーターによるrfaHプロモーターの置換は、「Red 駆動型組込み(Red-driven integration)」と呼ばれるDatsenko及びWannerに

よって初めて開発された方法 (“One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products.”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97(12), 6640-6645) を用いて行った。この手法に従い、PCRによって増幅されたDNA断片がゲノムDNAへ挿入された菌株を取得できる。

[0294] まず、*Pantoea ananatis* NA1 Δ c1129株 (W02010/027022A1) のゲノムDNAをテンプレートとし、プライマーrfaH-attL Fw (配列番号6) およびプライマーrfaH-Ptac Rv (配列番号7) を用いたPCRにより、プロモーター置換用DNA断片を増幅した。PCRにはPrimeStarポリメラーゼを用い、PCRサイクルは次の通りである。94°C 5分の後、98°C 5秒、55°C 10秒、72°C 3分を30サイクル、最後に4°C保温。プライマーrfaH-attL Fw (配列番号6) は、rfaH遺伝子上流に位置する領域及びNA1 Δ c1129株のゲノムDNAに存在するカナマイシン(Km)耐性を付与する遺伝子に隣接する領域の両者と相同性を有する。NA1 Δ c1129株のゲノムDNAに存在するKm耐性遺伝子kanは、 λ ファージのアタッチメントサイトであるattL及びattR遺伝子の間に挿入されており、さらにその下流にはtacプロモーター (Ptac; 配列番号8) がattL-kan-attR-Ptacの順で挿入されている。プライマーrfaH-Ptac Rv (配列番号7) は、rfaH領域及びNA1 Δ c1129株のゲノムDNAのtacプロモーターの下流に位置する領域の両者と相同性を有する。

[0295] 次に、*Escherichia coli* BL21(DE3)株 (ライフテクノロジーズ社, C6000-03) に温度感受性の複製起点を有するプラスミドpKD46 (Datsenko and Wanner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97:12:6640-45) を導入したBL21(DE3)/pKD46株に、上記で得られたPCR産物をエレクトロポレーションにより導入し、プロモーター領域の置換を行った。プラスミドpKD46は、アラビノース誘導性のParaBプロモーター制御下にある λ -Red相同組換え系の遺伝子 (γ 、 β 、エキソ遺伝子) を含み、ファージ λ (GenBankアクセッション番号J02459) の2154塩基 (31088-33241) のDNAフラグメントを含む。プラスミドpKD46は、PCR産物をBL21(DE3)株の染色体に組込むのに必要である。*Escherichia coli* BL21(DE3)/pKD46株をアンピシリン (100 mg/L) 含有LB培地において30

℃で一晩生育させた。この培養物を、アンピシリン及びL-アラビノース (1 mM) を含有するLB培地100 mLで100倍に希釈した。菌体を30℃で通気しながらOD 600が約0.3になるまで生育させ、それから100倍に濃縮し、氷冷したグリセロール水溶液(10%)で3回洗浄することによりエレクトロコンピテント化した。菌体70 µL及びPCR産物約100 ngを使用して、エレクトロポレーションを行った。エレクトロポレーション後に、菌体をSOC培地 (Sambrook et al., 著「モレキュラークローニング実験室マニュアル、第2版」(Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)) 1 mLで37℃ 2.5時間インキュベートし、LB寒天培地上にプレーティングし、37℃で生育させ、Km耐性株を選抜した。

[0296] rfaHプロモーターがtacプロモーターに置換されたことは、プロモーター置換後の塩基配列に特異的なプライマーrfaH CF (配列番号9) 及びプライマーrfaH CR (配列番号10) によるPCRによって確認した。PCRには、PrimeStarポリメラーゼを用いた。PCRサイクルは次の通りである。94℃ 5分の後、98℃ 5秒、55℃ 10秒、72℃ 2分を30サイクル、最後に4℃保温。1.6 kbpのDNA断片の増幅が確認できた株をBL21(DE3)-Ptac-rfaH(KmR)株とした。

[0297] BL21(DE3)-Ptac-rfaH(KmR)株からKm耐性マーカールを除去するために、プラスミドpMW118-int-xis (アンピシリン耐性 (AmpR)) を導入した (W02005/010175) 。AmpRクローンを、30℃で150 mg/Lのアンピシリンを含むLB寒天プレート上で生育させた。数十個のAmpRクローンを拾い、Km感受性株を選抜した。得られたKm感受性株をLB寒天プレート上で、42℃でインキュベートすることにより、プラスミドpMW118-int-xisをKm感受性株から除去した。得られたAmp感受性株をBL21(DE3)-Ptac-rfaH株とした。BL21(DE3)-Ptac-rfaH株に実施例1で作製したプラスミドpVK9-kfiABCDをエレクトロポレーション法によって導入し、BL21(DE3)-Ptac-rfaH/pVK9-kfiABCD株を取得した。実施例1に示すのと同じ培地および培養方法で試験管培養を行ない、カルバゾール法によってヘパロサン生産量を定量した。rfaH遺伝子の発現を増強していないBL21(DE3)/pVK9-kfiABCD株およびrfaH遺伝子の発現を増強したBL21(DE3)-Ptac-rfaH/pVK9-kfiABCD株のヘパロサン生産量を表4に示す。

[0298] [表4]

表4 BL21 (DE3)-Ptac-rfaH/pVK9-kfiABCD 株のヘパロサン生産量

菌株	ヘパロサン (mg/L)
BL21 (DE3) /pVK9-kfiABCD	290.4 ± 32.7
BL21 (DE3) -Ptac-rfaH/pVK9-kfiABCD	506.2 ± 69.9

[0299] (3-2) エシェリヒア・コリK5株のゲノムライブラリーの構築

エシェリヒア・コリK5株のゲノムDNAの断片をpSTV28ベクター（配列番号11、TaKaRa社）にクローニングし、ゲノムライブラリーを構築した。

[0300] ゲノムライブラリーの構築の詳細を以下に示す。エシェリヒア・コリK5株のゲノムDNA 3 μ gをDNA断片化装置（ハイドロシェアー、Gene machine社）を用いてランダムに断片化し、アガロース電気泳動によって分画した。アガロースゲルから約3-5 kbのDNAを含む断片を切り出して、DNAを抽出、精製した後、平滑末端処理を行った。次に、HincIIで消化し、Alkaline Phosphatase (E. coli C75) (TaKaRa社) により脱リン酸化した50 ngのプラスミドベクターpSTV28 (TaKaRa社) と上記のゲノムDNA断片とをライゲーションした。エレクトロポレーション法により、ライゲーション産物で大腸菌HST08株 (TaKaRa社) を形質転換した。得られた形質転換体の70%以上が約3-5 kbのインサートを含んでいた。形質転換体を培養して、プラスミドを抽出し、ゲノムライブラリーとした。

[0301] (3-3) ゲノムライブラリー導入によるヘパロサン生産能向上株の選別

BL21 (DE3)-Ptac-rfaH/pVK9-kfiABCD株にゲノムライブラリーまたはコントロールとしてpSTV28をエレクトロポレーション法により導入した。得られたゲノムライブラリートランスフォーマントより1クローンずつ選び、発酵生産培養に供した。培養には下記組成の培地を用いた。

[シード培地] (各成分の濃度は最終濃度)

トリプトン	10 g/L
イーストエキストラクト	5 g/L
塩化ナトリウム	10 g/L

シード培地は、120℃、20分のオートクレーブ滅菌した。

〔生産培地〕（各成分の濃度は最終濃度）

成分 1 :

グリセロール 10 g/L

成分 2 :

MOPS (3-N-morpholino-propanesulphonic acid) 41.9 g/L

成分 3 :

トリプトン 8.8 g/L

イーストエキストラクト 4.4 g/L

塩化ナトリウム 8.8 g/L

成分1および成分3は、それぞれ120℃、20分のオートクレーブ滅菌し、成分2はフィルター滅菌した。室温に冷却後、3者を混合した。

[0302] ヘパロサン生産培養は以下の手順で行った。まずは750 μ lのシード培地を張りこんだ96穴プレート（MEDISCAN社）にトランスフォーマントを1コロニーずつ植菌し、振とう装置（タイテック社）にて37℃で一晩振とう培養を行った。続いて、シード培養液を、試験管に2 mL張りこんだ生産培地中に20 μ l植菌し、37℃にて30時間振とう培養を行い、培地中のグリセロールが完全に消費された時点で培養を終了した。プラスミドを保持させるため、全培養行程でカナマイシン（25 mg/L）及びクロラムフェニコール（25 mg/L）を添加した。培地中に生産されたヘパロサンの定量は、カルバゾール法（Bitter, T. and Murir H. M., Anal. Biochem. 1962;4:330-334）により行った。同時に培養を行ったコントロールベクター（pSTV28）導入株と比較し、ヘパロサン蓄積量が上昇したクローンを単離した。単離されたクローンが保持するプラスミドに挿入された遺伝子を同定するため、プライマーpSTV Fw（配列番号12）及びプライマーpSTV Rv（配列番号13）を用い挿入されたDNA断片の塩基配列を決定した。その結果、プラスミドは、各々、rbsBKR-hsrA、glgBX、ybiXI JCB、rcsBD-micF、pcoESR、yhcN0-aaeBAX、g1455-alpA-g1453、yrbA-mlaBCDE F-yrbG、norW、ybjIJK-rybB、thrBAL-yjtD-yjjY、fruA-psuK、ytfT-yjffF-fbp、yagU-paoAB、gsiCD-yliE、irp（一部）、bhsA-ycfS、lepB-rnc-era、dapA-

gcvR-bcp-hyfA、rpoE-nadB-yfiC-srmB、g1414-g1413、nuoEFG、glmZ-hemYXD、rlmL、artQMJ-rlmC-ybj0、yej0ML、rpoS-ygbNML、g3798-g3797-g3796-g3795-g3794-g3793-g3792、ryjA-soxRS-yjcCB、efeU0を含むことが明らかになった。なお、irp（一部）とは、irp2遺伝子の一部およびirp1遺伝子の一部である。rbsBKR-hsrA、glgBX、ybiXIJC、rcsBD-micF、pcoESR、yhcN0-aaeBAX、g1455-alpA-g1453、yrbA-mlaBCDEF-yrbG、norW、ybjIJK-rybB、thrBAL-yjtD-yjjY、fruA-psuK、ytfT-yjff-fbp、yagU-paoAB、gsiCD-yliE、irp（一部）、bhsA-ycfS、lepB-rnc-era、dapA-gcvR-bcp-hyfA、rpoE-nadB-yfiC-srmB、g1414-g1413、nuoEFG、glmZ-hemYXD、rlmL、artQMJ-rlmC-ybj0、yej0ML、rpoS-ygbNML、g3798-g3797-g3796-g3795-g3794-g3793-g3792、ryjA-soxRS-yjcCB、efeU0を含む挿入断片の塩基配列を、それぞれ、配列番号29、34、37、43、50、54、60、64、72、74、78、84、87、91、95、99、104、107、111、116、121、124、128、132、134、140、144、149、157、162に示す。単離されたクローンよりプラスミドpSTV28-rbsBKR-hsrA、pSTV28-glgBX、pSTV28-ybiXIJC、pSTV28-rcsBD-micF、pSTV28-pcoESR、pSTV28-yhcN0-aaeBAX、pSTV28-g1455-alpA-g1453、pSTV28-yrbA-mlaBCDEF-yrbG、pSTV28-norW、pSTV28-ybjIJK-rybB、pSTV28-thrBAL-yjtD-yjjY、pSTV28-fruA-psuK、pSTV28-ytfT-yjff-fbp、pSTV28-yagU-paoAB、pSTV28-gsiCD-yliE、pSTV28-irp、pSTV28-bhsA-ycfS、pSTV28-lepB-rnc-era、pSTV28-dapA-gcvR-bcp-hyfA、pSTV28-rpoE-nadB-yfiC-srmB、pSTV28-g1414-g1413、pSTV28-nuoEFG、pSTV28-glmZ-hemYXD、pSTV28-rlmL、pSTV28-artQMJ-rlmC-ybj0、pSTV28-yej0ML、pSTV28-rpoS-ygbNML、pSTV28-g3798-g3797-g3796-g3795-g3794-g3793-g3792、pSTV28-ryjA-soxRS-yjcCB、pSTV28-efeU0を抽出した。

[0303] 実施例4：rbsBKR-hsrA、glgBX、ybiXIJC、rcsBD-micF遺伝子の発現増強株によるヘパロサン生産（1）

実施例1にて構築したエシェリヒア・コリBL21(DE3)-Ptac-rfaH/pVK9-kfiABCD株に、実施例3にて単離したpSTV28-rbsBKR-hsrA、pSTV28-glgBX、pSTV28-ybiXIJC、pSTV28-rcsBD-micF、及びコントロールとしてpSTV28をそれぞれ

導入した菌株を構築した。これらの菌株の発酵生産培養を行い、ヘパロサンの生産量を比較した。実施例 1 に示すのと同じ培地および培養方法で各株とも4連で試験管培養を行ない、カルバゾール法によってヘパロサンを定量した。定量したヘパロサン濃度について各平均値と標準偏差を表 5 に示した。

[0304] [表5]

表 5 BL21 (DE3)-Ptac-rfaH/pVK9-kfiABCD 株における rbsBKR-hsrA、glgBX、ybiXIJC、micF-rcsDB 遺伝子の発現増強の効果

菌株	ヘパロサン (mg/L)
BL21 (DE3)-Ptac-rfaH/pVK9-kfiABCD/pSTV28	529.6 ± 46.3
BL21 (DE3)-Ptac-rfaH/pVK9-kfiABCD/pSTV28-rbsBKR-hsrA	766.4 ± 156.7
BL21 (DE3)-Ptac-rfaH/pVK9-kfiABCD/pSTV28-glgBX	679.8 ± 9.7
BL21 (DE3)-Ptac-rfaH/pVK9-kfiABCD/pSTV28-ybiXIJC	753.4 ± 129.2
BL21 (DE3)-Ptac-rfaH/pVK9-kfiABCD/pSTV28-micF-rcsDB	656.7 ± 57.7

[0305] 実施例 5 : rbsBKR-hsrA、glgBX、ybiXIJC、rcsBD-micF 遺伝子の発現増強株によるヘパロサン生産 (2)

実施例 1 にて構築したエシェリヒア・コリ BL21 (DE3)/pVK9-kfiABCD 株に、実施例 3 にて単離した pSTV28-rbsBKR-hsrA、pSTV28-glgBX、pSTV28-ybiXIJC、pSTV28-rcsBD-micF、及びコントロールとして pSTV28 をそれぞれ導入した菌株を構築した。これらの菌株の発酵生産培養を行い、ヘパロサンの生産量を比較した。実施例 1 に示すのと同じ培地および培養方法で各株とも4連で試験管培養を行ない、カルバゾール法によってヘパロサンを定量した。定量したヘパロサン濃度について各平均値と標準偏差を表 6 に示した。

[0306] [表6]

表 6 BL21 (DE3)/pVK9-kfiABCD 株における rbsBKR-hsrA、glgBX、ybiXIJC、micF-rcsDB 遺伝子の発現増強の効果

菌株	ヘパロサン (mg/L)
BL21 (DE3)/pVK9-kfiABCD/pSTV28	145.3 ± 14.3
BL21 (DE3)/pVK9-kfiABCD/pSTV28-rbsBKR-hsrA	286.9 ± 53.3
BL21 (DE3)/pVK9-kfiABCD/pSTV28-glgBX	238.7 ± 44.2
BL21 (DE3)/pVK9-kfiABCD/pSTV28-ybiXIJC	238.1 ± 55.4
BL21 (DE3)/pVK9-kfiABCD/pSTV28-micF-rcsDB	167.0 ± 7.0

[0307] 実施例 6 : rfaH 遺伝子の発現増強株によるヘパロサン生産

(6-1) エシェリヒア・コリ B 株の rfaH 遺伝子の発現プラスミドの構築

エシェリヒア・コリBL21(DE3)株よりrfaH遺伝子をpMIV-Pnlp0-terにクローニングし、rfaH遺伝子の発現プラスミドpMIV-Pnlp0-rfaHを構築した。pMIV-Pnlp0-terには強力なnlp0プロモーター (Pnlp0) とrrnBターミネーターが組み込まれており、プロモーターとターミネーターの間に目的の遺伝子を挿入することで発現ユニットとして機能させることができる。「Pnlp0」はエシェリヒア・コリ K-12株由来の野生型nlpD遺伝子のプロモーターを示す。

[0308] 発現プラスミドの構築の詳細を以下に示す。エシェリヒア・コリMG1655の染色体DNAをテンプレートとして、プライマーP1（配列番号14）及びプライマーP2（配列番号15）を用いたPCRによって、nlpD遺伝子のプロモーター領域（以下、野生型nlpD遺伝子プロモーターを「Pnlp0」と記載する。）約300 bpを含むDNA断片を取得した。これらプライマーの5' 末端には制限酵素SalI及びPaeIのサイトがそれぞれデザインされている。PCRサイクルは次の通りである。95℃ 3分の後、95℃ 60秒、50℃ 30秒、72℃ 40秒を2サイクル、94℃ 20秒、55℃ 20秒、72℃ 15秒を25サイクル、最後に72℃ 5分。得られた断片をSalI及びPaeIで処理し、pMIV-5JS（特開2008-99668）のSalI-PaeIサイトに挿入し、プラスミドpMIV-Pnlp0を取得した。このpMIV-Pnlp0プラスミドに挿入されたPnlp0プロモーターのPaeI-SalI断片の塩基配列は配列番号16に示したとおりである。

[0309] 次に、MG1655の染色体DNAをテンプレートとして、プライマーP3（配列番号17）及びプライマーP4（配列番号18）を用いたPCRによってrrnB遺伝子のターミネーター領域約300 bpを含むDNA断片（配列番号19）を取得した。これらプライマーの5' 末端には制限酵素XbaI及びBamHIのサイトがそれぞれデザインされている。PCRサイクルは次の通りである。95℃ 3分の後、95℃60秒、50℃ 30秒、72℃ 40秒を2サイクル、94℃ 20秒、59℃ 20秒、72℃ 15秒を25サイクル、最後に72℃ 5分。得られた断片をXbaI及びBamHIで処理し、pMIV-Pnlp0のXbaI-BamHIサイトに挿入し、プラスミドpMIV-Pnlp0-terを取得した。

[0310] 続いてエシェリヒア・コリBL21(DE3)株の染色体DNAをテンプレートとして、プライマーrfaH Fw（配列番号20）およびプライマーrfaH Rv（配列番号21

を用いたPCRによって、rfaH遺伝子断片を取得した。これらプライマーの5'末端には制限酵素SalI及びXbaIのサイトがそれぞれデザインされている。PCRにはPrimeStarポリメラーゼを用い、PCRサイクルは次の通りである。94℃ 5分の後、98℃ 5秒、55℃ 10秒、72℃ 4分を30サイクル、最後に4℃保温。得られた断片をSalI及びXbaIで処理し、pMIV-Pnlp0-terのSalI-XbaIサイトに挿入しプラスミドpMIV-Pnlp0-rfaHを取得した。こうして、pMIV-5JSベクター上に、nlpDプロモーター、rfaH遺伝子、及びrrnBターミネーターが、この順に繋がったrfaHの発現ユニットが構築された。今回クローニングされたエシェリヒア・コリBL21(DE3)株のrfaH遺伝子の塩基配列を配列番号46に示す。

[0311] (6-2) rfaH遺伝子の発現増強株によるヘパロサン生産

実施例1にて構築したエシェリヒア・コリBL21(DE3)/pVK9-kfiABCD株に、pMIV-Pnlp0-rfaH及びコントロールとしてpMIV-5JSをそれぞれ導入した菌株を構築した。これらの菌株の発酵生産培養を行い、ヘパロサンの生産量を比較した。培地、培養方法、及びヘパロサンの定量方法は前述の手法に準じた。定量したヘパロサン濃度について各平均値と標準偏差を表7に示した。

[0312] [表7]

表7 BL21(DE3)/pVK9-kfiABCD株におけるrfaH遺伝子の発現増強の効果

菌株	ヘパロサン(mg/L)
BL21(DE3)/pVK9-kfiABCD/pMIV-5JS	376.9±48.3
BL21(DE3)/pVK9-kfiABCD/pMIV-Pnlp0-rfaH	857.9±219.1

[0313] 実施例7：nusG遺伝子の発現増強株によるヘパロサン生産

(7-1) エシェリヒア・コリB株のnusG遺伝子の発現プラスミドの構築

エシェリヒア・コリBL21(DE3)株の染色体DNAをテンプレートとして、プライマーnusG Fw(配列番号22)およびプライマーnusG Rv(配列番号23)を用いたPCRによって、nusG遺伝子断片を取得した。これらプライマーの5'末端には制限酵素SalI及びXbaIのサイトがそれぞれデザインされている。PCRにはPrimeStarポリメラーゼを用い、PCRサイクルは次の通りである。94℃ 5分の後、98℃ 5秒、55℃ 10秒、72℃ 4分を30サイクル、最後に4℃保温。得られた断片をSalI及びXbaIで処理し、同制限酵素で処理したpMIV-Pnlp0-terのSal

I-XbaIサイトに挿入し、nusG遺伝子がクローニングされたプラスミドpMIV-Pnlp0-nusGを取得した。今回クローニングされたエシェリヒア・コリBL21(DE3)株のnusG遺伝子の塩基配列を配列番号48に示す。

[0314] (7-2) nusG遺伝子の発現増強株によるヘパロサン生産

実施例1にて構築したエシェリヒア・コリBL21(DE3)/pVK9-kfiABCD株に、pMIV-Pnlp0-nusG及びコントロールとしてpMIV-5JSをそれぞれ導入した菌株を構築した。これらの菌株の発酵生産培養を行い、ヘパロサンの生産量を比較した。培地、培養方法、及びヘパロサンの定量方法は前述の手法に準じた。定量したヘパロサンについて各平均値と標準偏差を表8に示した。

[0315] [表8]

表8 BL21(DE3)/pVK9-kfiABCD株における nusG 遺伝子の発現増強の効果

菌株	ヘパロサン (mg/L)
BL21 (DE3) /pVK9-kfiABCD/pMIV-5JS	376.9 ± 48.3
BL21 (DE3) /pVK9-kfiABCD/pMIV-Pnlp0-nusG	618.1 ± 14.6

[0316] 実施例8 : pcoESR、yhcN0-aaeBAX、g1455-alpA-g1453、yrbA-mlaBCDEF-yrbG、norW、ybjIJK-rybB、thrBAL-yjtD-yjjY、fruA-psuK、ytfT-yjffF-fbp、yagU-paoAB、gsiCD-yliE、irp (一部)、bhsA-ycfS遺伝子の発現増強株によるヘパロサン生産 (1)

実施例1にて構築したエシェリヒア・コリBL21(DE3)-Ptac-rfaH/pVK9-kfiABCD株に、実施例3にて単離したpSTV28-pcoESR、pSTV28-yhcN0-aaeBAX、pSTV28-g1455-alpA-g1453、pSTV28-yrbA-mlaBCDEF-yrbG、pSTV28-norW、pSTV28-ybjIJK-rybB、pSTV28-thrBAL-yjtD-yjjY、pSTV28-fruA-psuK、pSTV28-ytfT-yjffF-fbp、pSTV28-yagU-paoAB、pSTV28-gsiCD-yliE、pSTV28-irp、pSTV28-bhsA-ycfS、及びコントロールとしてpSTV28をそれぞれ導入した菌株を構築した。これらの菌株の発酵生産培養を行い、ヘパロサンの生産量を比較した。実施例1に示すのと同じ培地および培養方法で各株とも4連で試験管培養を行ない、カルバゾール法によってヘパロサンを定量した。定量したヘパロサン濃度について各平均値と標準偏差を表9に示した。

[0317]

[表9]

表 9 BL21(DE3)-Ptac-rfaH/pVK9-kfiABCD 株における pcoESR、yhcN0-aaeBAX、g1455-alpA-g1453、yrbA-mlaBCDEF-yrbG、norW、ybjIJK-rybB、thrBAL-yjtD-yjjY、fruA-psuK、ytfT-yjff-fbp、yagU-paoAB、gsiCD-yliE、irp (一部)、bhsA-ycfS 遺伝子の発現増強の効果

菌株	ヘパロサン (mg/L)
BL21 (DE3)-Ptac-rfaH/pVK9-kfiABCD/pSTV28	559.8 ± 72.6
BL21 (DE3)-Ptac-rfaH/pVK9-kfiABCD/pSTV28-pcoESR	692.0 ± 95.1
BL21 (DE3)-Ptac-rfaH/pVK9-kfiABCD/pSTV28-yhcN0-aaeBAX	663.3 ± 136.1
BL21 (DE3)-Ptac-rfaH/pVK9-kfiABCD/pSTV28-g1455-alpA-g1453	843.1 ± 81.5
BL21 (DE3)-Ptac-rfaH/pVK9-kfiABCD/pSTV28-yrbA-mlaBCDEF-yrbG	877.8 ± 137.8
BL21 (DE3)-Ptac-rfaH/pVK9-kfiABCD/pSTV28-norW	741.0 ± 21.1
BL21 (DE3)-Ptac-rfaH/pVK9-kfiABCD/pSTV28-ybjIJK-rybB	796.0 ± 235.8
BL21 (DE3)-Ptac-rfaH/pVK9-kfiABCD/pSTV28-thrBAL-yjtD-yjjY	635.1 ± 7.9
BL21 (DE3)-Ptac-rfaH/pVK9-kfiABCD/pSTV28-fruA-psuK	826.0 ± 125.1
BL21 (DE3)-Ptac-rfaH/pVK9-kfiABCD/pSTV28-ytfT-yjff-fbp	872.3 ± 20.1
BL21 (DE3)-Ptac-rfaH/pVK9-kfiABCD/pSTV28-yagU-paoAB	690.2 ± 63.1
BL21 (DE3)-Ptac-rfaH/pVK9-kfiABCD/pSTV28-gsiCD-yliE	804.1 ± 92.9
BL21 (DE3)-Ptac-rfaH/pVK9-kfiABCD/pSTV28-irp	691.5 ± 92.4
BL21 (DE3)-Ptac-rfaH/pVK9-kfiABCD/pSTV28-bhsA-ycfS	994.3 ± 124.1

[0318] 実施例 9 : pcoESR、yhcN0-aaeBAX、g1455-alpA-g1453、yrbA-mlaBCDEF-yrbG、norW、ybjIJK-rybB、thrBAL-yjtD-yjjY、fruA-psuK、ytfT-yjff-fbp、yagU-paoAB、gsiCD-yliE、irp (一部)、bhsA-ycfS 遺伝子の発現増強株によるヘパロサン生産 (2)

実施例 1 にて構築したエシェリヒア・コリ BL21(DE3)/pVK9-kfiABCD 株に、実施例 3 にて単離した pSTV28-pcoESR、pSTV28-yhcN0-aaeBAX、pSTV28-g1455-alpA-g1453、pSTV28-yrbA-mlaBCDEF-yrbG、pSTV28-norW、pSTV28-ybjIJK-rybB、pSTV28-thrBAL-yjtD-yjjY、pSTV28-fruA-psuK、pSTV28-ytfT-yjff-fbp、pSTV28-yagU-paoAB、pSTV28-gsiCD-yliE、pSTV28-irp、pSTV28-bhsA-ycfS、及びコントロールとして pSTV28 を導入した菌株を構築した。これらの菌株の発酵生産培養を行い、ヘパロサンの生産量を比較した。実施例 1 に示すのと同じ培地および培養方法で各株とも 4 連で試験管培養を行ない、カルバゾール法によってヘパロサンを定量した。定量したヘパロサン濃度について各平均値と標準偏差を表 10 に示した。

[0319]

[表10]

表10 BL21(DE3)/pVK9-kfiABCD株における pcoESR、yhcN0-aaeBAX、g1455-alpA-g1453、yrbA-mlaBCDEF-yrbG、norW、ybjIJK-rybB、thrBAL-yjtD-yjjY、fruA-psuK、ytfT-yjff-fbp、yagU-paoAB、gsiCD-yliE、irp (一部)、bhsA-ycfS 遺伝子の発現増強の効果

菌株	ヘパロサン (mg/L)
BL21 (DE3) /pVK9-kfiABCD/pSTV28	106.4±12.4
BL21 (DE3) /pVK9-kfiABCD/pSTV28-pcoESR	260.8±47.8
BL21 (DE3) /pVK9-kfiABCD/pSTV28-yhcN0-aaeBAX	237.2±36.6
BL21 (DE3) /pVK9-kfiABCD/pSTV28-g1455-alpA-g1453	225.6±8.5
BL21 (DE3) /pVK9-kfiABCD/pSTV28-yrbA-mlaBCDEF-yrbG	215.2±14.9
BL21 (DE3) /pVK9-kfiABCD/pSTV28-norW	216.4±36.6
BL21 (DE3) /pVK9-kfiABCD/pSTV28-ybjIJK-rybB	301.9±46.9
BL21 (DE3) /pVK9-kfiABCD/pSTV28-thrBAL-yjtD-yjjY	327.2±39.8
BL21 (DE3) /pVK9-kfiABCD/pSTV28-fruA-psuK	209.3±8.1
BL21 (DE3) /pVK9-kfiABCD/pSTV28-ytfT-yjff-fbp	220.1±18.5
BL21 (DE3) /pVK9-kfiABCD/pSTV28-yagU-paoAB	258.0±26.4
BL21 (DE3) /pVK9-kfiABCD/pSTV28-gsiCD-yliE	323.3±15.5
BL21 (DE3) /pVK9-kfiABCD/pSTV28-irp	202.0±15.0
BL21 (DE3) /pVK9-kfiABCD/pSTV28-bhsA-ycfS	225.5±37.4

[0320] 実施例10: lepB-rnc-era、dapA-gcvR-bcp-hyfA、rpoE-nadB-yfiC-srmB、g1414-g1413、nuoEFG、glmZ-hemYXD、rlmL、artQMJ-rlmC-ybj0、yej0ML、rpoS-ygbNML、g3798-g3797-g3796-g3795-g3794-g3793-g3792、ryjA-soxRS-yjcCB、efeU0遺伝子の発現増強株によるヘパロサン生産

実施例1にて構築したエシェリヒア・コリBL21(DE3)/pVK9-kfiABCD株に、実施例3にて単離したpSTV28-lepB-rnc-era、pSTV28-dapA-gcvR-bcp-hyfA、pSTV28-rpoE-nadB-yfiC-srmB、pSTV28-g1414-g1413、pSTV28-nuoEFG、pSTV28-glmZ-hemYXD、pSTV28-rlmL、pSTV28-artQMJ-rlmC-ybj0、pSTV28-yej0ML、pSTV28-rpoS-ygbNML、pSTV28-g3798-g3797-g3796-g3795-g3794-g3793-g3792、pSTV28-ryjA-soxRS-yjcCB、pSTV28-efeU0、及びコントロールとしてpSTV28を導入した菌株を構築した。これらの菌株の発酵生産培養を行い、ヘパロサンの生産量を比較した。実施例1に示すのと同じ培地および培養方法で各株とも4連で試験管培養を行ない、カルバゾール法によってヘパロサンを定量した。定量したヘパロサン濃度について各平均値と標準偏差を表11および表12に示した。

[0321]

[表11]

表 1 1 BL21 (DE3)/pVK9-kfiABCD 株における lepB-rnc-era、dapA-gcvR-bcp-hyfA、rpoE-nadB-yfiC-srmB、gl1414-gl1413、nuoEFG、glmZ-hemYXD 遺伝子の発現増強の効果

菌株	ヘパロサン (mg/L)
BL21 (DE3)/pVK9-kfiABCD/pSTV28	210.4 ± 23.6
BL21 (DE3)/pVK9-kfiABCD/pSTV28-lepB-rnc-era	488.7 ± 83.5
BL21 (DE3)/pVK9-kfiABCD/pSTV28-dapA-gcvR-bcp-hyfA	379.8 ± 49.1
BL21 (DE3)/pVK9-kfiABCD/pSTV28-rpoE-nadB-yfiC-srmB	282.9 ± 54.1
BL21 (DE3)/pVK9-kfiABCD/pSTV28-gl1414-gl1413	423.9 ± 119.5
BL21 (DE3)/pVK9-kfiABCD/pSTV28-nuoEFG	428.5 ± 64.6
BL21 (DE3)/pVK9-kfiABCD/pSTV28-glmZ-hemYXD	604.2 ± 177.5

[0322] [表12]

表 1 2 BL21 (DE3)/pVK9-kfiABCD 株における rlmL、artQMJ-rlmC-ybj0、yejOML、rpoS-ygbNML、g3798-g3797-g3796-g3795-g3794-g3793-g3792、ryjA-soxRS-yjcCB、efeUO 遺伝子の発現増強の効果

菌株	ヘパロサン (mg/L)
BL21 (DE3)/pVK9-kfiABCD/pSTV28	147.4 ± 16.3
BL21 (DE3)/pVK9-kfiABCD/pSTV28-rlmL	242.7 ± 45.8
BL21 (DE3)/pVK9-kfiABCD/pSTV28-artQMJ-rlmC-ybj0	243.4 ± 97.9
BL21 (DE3)/pVK9-kfiABCD/pSTV28-yejOML	310.7 ± 40.8
BL21 (DE3)/pVK9-kfiABCD/pSTV28-rpoS-ygbNML	257.1 ± 56.8
BL21 (DE3)/pVK9-kfiABCD/pSTV28-g3798-g3797-g3796-g3795-g3794-g3793-g3792	251.6 ± 68.5
BL21 (DE3)/pVK9-kfiABCD/pSTV28-ryjA-soxRS-yjcCB	287.5 ± 46.0
BL21 (DE3)/pVK9-kfiABCD/pSTV28-efeUO	385.7 ± 88.5

[0323] 実施例 1 1 : rpoE 遺伝子の発現増強株によるヘパロサン生産

(1 1 - 1) エシェリヒア・コリ K5 株の rpoE 遺伝子の発現プラスミドの構築
 エシェリヒア・コリ K5 株より rpoE 遺伝子を pMIV-Pnlp8-ter にクローニングし、rpoE 遺伝子の発現プラスミド pMIV-Pnlp8-rpoE を構築した。pMIV-Pnlp8-ter には強力な nlp8 プロモーター (Pnlp8) が組み込まれており、プロモーターとターミネーターの間に目的の遺伝子を挿入することで発現ユニットとして機能させることができる。「Pnlp8」はエシェリヒア・コリ K-12 株由来の変異型 nlpD 遺伝子のプロモーターを示す。

[0324] 発現ベクター pMIV-Pnlp8-ter の構築の詳細を以下に示す。野生型 nlpD プロモーター (Pnlp0) の -10 領域を改変することでより強力なプロモーターとするため、以下の手法で -10 領域のランダム化を行った。野生型 nlpD プロモーター領域 (図 1 ; 配列番号 165) には、プロモーターとして機能すると推定され

る2箇所の領域が存在し、それぞれ図中ではPnlp1およびPnlp2と示してある。実施例6で構築したプラスミドpMIV-Pnlp0-terをテンプレートとして、プライマーP1（配列番号14）及びプライマーP7（配列番号166）を用いたPCRによって、野生型nlpDプロモーター（Pnlp0）の3'末端側に含まれる-10領域（-10(Pnlp1)）をランダム化したDNA断片を取得した。PCRサイクルは次の通りである。95℃ 3分の後、95℃ 60秒、50℃ 30秒、72℃ 40秒を2サイクル、94℃ 20秒、60℃ 20秒、72℃ 15秒を25サイクル、最後に72℃ 5分。

[0325] 同様に、プラスミドpMIV-Pnlp0-terをテンプレートとして、プライマーP2（配列番号15）及びプライマーP8（配列番号167）を用いたPCRによって、野生型nlpDプロモーター（Pnlp0）の5'末端側に含まれる-10領域（-10(Pnlp2)）をランダム化したDNA断片を取得した。PCRサイクルは次の通りである。95℃ 3分の後、95℃ 60秒、50℃ 30秒、72℃ 40秒を2サイクル、94℃ 20秒、60℃ 20秒、72℃ 15秒を25サイクル、最後に72℃ 5分。

[0326] 得られた3'末端側と5'末端側の断片を、プライマーP7とP8にデザインされたBglIIサイトによってつなぎ合わせ、2箇所の-10領域がランダム化された変異型nlpDプロモーター全長を含むDNA断片を構築した。このDNA断片をテンプレートとして、プライマーP1及びプライマーP2を用いたPCRによって、変異型nlpDプロモーター全長を含むDNA断片を増幅した。PCRサイクルは次の通りである。95℃ 3分の後、95℃ 60秒、50℃ 30秒、72℃ 40秒を2サイクル、94℃ 20秒、60℃ 20秒、72℃ 15秒を12サイクル、最後に72℃ 5分。

[0327] 増幅した変異型nlpDプロモーター全長を含むDNA断片を、プライマーの5'末端にデザインされている制限酵素SalI及びPaeIで処理し、同じくSalI及びPaeIで処理したプラスミドpMIV-Pnlp0-terに挿入することで、プラスミド上の野生型nlpDプロモーター（Pnlp0）を変異型nlpDプロモーターと置き換えた。こうして得られたプラスミドの内、図2に示すプロモーター配列（Pnlp8；配列番号168）を有するものを選び、pMIV-Pnlp8-terとした。このプラスミドに挿入されたPnlp8プロモーターのPaeI-SalI断片の塩基配列は配列番号169に示したとおりである。

[0328] *rpoE*遺伝子の発現プラスミドpMIV-Pnlp8-*rpoE*の構築の詳細を以下に示す。
エシェリヒア・コリK5の染色体DNAをテンプレートとして、プライマー*rpoE*-SalI Fw（配列番号170）及びプライマー*rpoE*-*xba* Rv（配列番号171）を用いたPCRによって、*rpoE*遺伝子のDNA断片を取得した。PCRにはPrimeStarポリメラーゼ（TaKaRa社）を用い、プロトコールに記載の反応組成で行った。PCRサイクルは次の通りである。94℃ 5分の後、98℃ 5秒、55℃ 10秒、72℃ 2分を30サイクル、最後に4℃保温。また、pMIV-Pnlp8-*ter*をテンプレートDNAとし、配列番号172及び配列番号173のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いたPCRによって、pMIV-Pnlp8-*ter*のDNA断片を得た。PCRにはPrimeStarポリメラーゼを用い、プロトコールに記載の反応組成で行った。PCRサイクルは次の通りである。94℃ 5分の後、98℃ 5秒、55℃ 10秒、72℃ 6分を30サイクル、最後に4℃保温。得られた両DNA断片をIn-FusionRHDクローニングキット（クロンテック社製）を用いて連結し、*rpoE*遺伝子の発現プラスミドpMIV-Pnlp8-*rpoE*を構築した。クローニングされた*rpoE*遺伝子の塩基配列を配列番号174に示す。

[0329] (11-2) *rpoE*遺伝子の発現増強株によるヘパロサン生産

実施例1にて構築したエシェリヒア・コリBL21(DE3)/pVK9-*kfi*ABCD株に、pMIV-Pnlp8-*rpoE*及びコントロールとしてpMIV-5JSをそれぞれ導入した菌株を構築した。これらの菌株の発酵生産培養を行い、ヘパロサンの生産量を比較した。培地、培養方法、及びヘパロサンの定量方法は前述の手法に準じた。定量したヘパロサンについて各平均値と標準偏差を表13に示した。

[0330] [表13]

表13 BL21(DE3)/pVK9- <i>kfi</i> ABCD株における <i>rpoE</i> 遺伝子の発現増強の効果	
菌株	ヘパロサン(mg/L)
BL21(DE3)/pVK9- <i>kfi</i> ABCD/pMIV-5JS	96.1 ± 5.8
BL21(DE3)/pVK9- <i>kfi</i> ABCD/pMIV-Pnlp8- <i>rpoE</i>	183.6 ± 7.8

産業上の利用可能性

[0331] 本発明によれば、細菌のヘパロサン生産能を向上させることができ、ヘパロサンを効率よく製造することができる。

[0332] <配列表の説明>

配列番号 1 : pVK9の塩基配列

配列番号 2 ~ 7 : プライマー

配列番号 8 : tacプロモーターの塩基配列

配列番号 9、10 : プライマー

配列番号 11 : pSTV28の塩基配列

配列番号 12 ~ 15 : プライマー

配列番号 16 : 野生型nlpDプロモーター (Pnlp0) を含むPaeI-SalI断片の塩基配列

配列番号 17、18 : プライマー

配列番号 19 : rrnBターミネーターの塩基配列

配列番号 20 ~ 23 : プライマー

配列番号 24 : エシェリヒア・コリK5株のkfiABCDオペロンの塩基配列

配列番号 25 : エシェリヒア・コリK5株のKfiAタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 26 : エシェリヒア・コリK5株のKfiBタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 27 : エシェリヒア・コリK5株のKfiCタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 28 : エシェリヒア・コリK5株のKfiDタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 29 : エシェリヒア・コリK5株のrbsBKR-hsrA遺伝子を含む領域の塩基配列

配列番号 30 : エシェリヒア・コリK5株のRbsBタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 31 : エシェリヒア・コリK5株のRbsKタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 32 : エシェリヒア・コリK5株のRbsRタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 33 : エシェリヒア・コリK5株のHsrAタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 34 : エシェリヒア・コリK5株のglgBX遺伝子を含む領域の塩基配列

配列番号 35 : エシェリヒア・コリK5株のGlgBタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 36 : エシェリヒア・コリK5株のGlgXタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 37 : エシェリヒア・コリK5株のybiXIJC遺伝子を含む領域の塩基配列

配列番号 38 : エシェリヒア・コリK5株のYbiXタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 39 : エシェリヒア・コリK5株のYbiIタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 40 : エシェリヒア・コリK5株のYbiJタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 41 : エシェリヒア・コリK5株のYbiGタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 42 : エシェリヒア・コリK5株のYbiBタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 43 : エシェリヒア・コリK5株のrcsBD-micF遺伝子を含む領域の塩基配列

配列番号 44 : エシェリヒア・コリK5株のRcsBタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 45 : エシェリヒア・コリK5株のRcsDタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 46 : エシェリヒア・コリBL21(DE3)株のrfaH遺伝子の塩基配列

配列番号 47 : エシェリヒア・コリBL21(DE3)株のRfaHタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 48 : エシェリヒア・コリBL21(DE3)株のnusG遺伝子の塩基配列

配列番号 49 : エシェリヒア・コリBL21(DE3)株のNusGタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 50 : エシェリヒア・コリK5株のpcoRSE遺伝子を含む領域の塩基配列

配列番号 51 : エシェリヒア・コリK5株のPcoRタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 52 : エシェリヒア・コリK5株のPcoSタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 53 : エシェリヒア・コリK5株のPcoEタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 54 : エシェリヒア・コリK5株のyhcN0-aaeBAX遺伝子を含む領域の塩基配列

配列番号 55 : エシェリヒア・コリK5株のYchNタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 56 : エシェリヒア・コリK5株のYchOタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 57 : エシェリヒア・コリK5株のAaeBタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 58 : エシェリヒア・コリK5株のAaeAタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 59 : エシェリヒア・コリK5株のAaeXタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 60 : エシェリヒア・コリK5株のg1455-alpA-g1453遺伝子を含む領域

域の塩基配列

配列番号 6 1 : エシェリヒア・コリK5株のG1455タンパク質のアミノ酸配列

配列番号 6 2 : エシェリヒア・コリK5株のAlpAタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 6 3 : エシェリヒア・コリK5株のG1453タンパク質のアミノ酸配列

配列番号 6 4 : エシェリヒア・コリK5株のyrbA-mlaBCDEF-yrbG遺伝子を含む領域の塩基配列

配列番号 6 5 : エシェリヒア・コリK5株のYrbAタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 6 6 : エシェリヒア・コリK5株のMlaBタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 6 7 : エシェリヒア・コリK5株のMlaCタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 6 8 : エシェリヒア・コリK5株のMlaDタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 6 9 : エシェリヒア・コリK5株のMlaEタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 7 0 : エシェリヒア・コリK5株のMlaFタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 7 1 : エシェリヒア・コリK5株のYrbGタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 7 2 : エシェリヒア・コリK5株のnorW遺伝子を含む領域の塩基配列

配列番号 7 3 : エシェリヒア・コリK5株のNorWタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 7 4 : エシェリヒア・コリK5株のybjIJK-rybB遺伝子を含む領域の塩基配列

配列番号 7 5 : エシェリヒア・コリK5株のYbjIタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 7 6 : エシェリヒア・コリK5株のYbjJタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 7 7 : エシェリヒア・コリK5株のYbjKタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 7 8 : エシェリヒア・コリK5株のyjjY-yjtD-thrLAB遺伝子を含む領域の塩基配列

配列番号 7 9 : エシェリヒア・コリK5株のYjjYタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 8 0 : エシェリヒア・コリK5株のYjtDタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 8 1 : エシェリヒア・コリK5株のThrLタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 8 2 : エシェリヒア・コリK5株のThrAタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 8 3 : エシェリヒア・コリK5株のThrBタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 8 4 : エシェリヒア・コリK5株のfruA-psuK遺伝子を含む領域の塩基

配列

配列番号 85 : エシェリヒア・コリK5株のFruAタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 86 : エシェリヒア・コリK5株のPsuKタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 87 : エシェリヒア・コリK5株のytfT-yjfF-fbp遺伝子を含む領域の塩基配列

配列番号 88 : エシェリヒア・コリK5株のYtfTタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 89 : エシェリヒア・コリK5株のYjfFタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 90 : エシェリヒア・コリK5株のFbpタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 91 : エシェリヒア・コリK5株のyagU-paoAB遺伝子を含む領域の塩基配列

配列番号 92 : エシェリヒア・コリK5株のYagUタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 93 : エシェリヒア・コリK5株のPaoAタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 94 : エシェリヒア・コリK5株のPaoBタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 95 : エシェリヒア・コリK5株のgsiCD-yliE遺伝子を含む領域の塩基配列

配列番号 96 : エシェリヒア・コリK5株のGsiCタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 97 : エシェリヒア・コリK5株のGsiDタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 98 : エシェリヒア・コリK5株のYliEタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 99 : エシェリヒア・コリK5株のirp遺伝子の一部を含む領域の塩基配列

配列番号 100 : エシェリヒア・コリK5株のirp2遺伝子の塩基配列

配列番号 101 : エシェリヒア・コリK5株のIrp2タンパク質のアミノ酸配列

配列番号 102 : エシェリヒア・コリK5株のirp1遺伝子の塩基配列

配列番号 103 : エシェリヒア・コリK5株のIrp1タンパク質のアミノ酸配列

配列番号 104 : エシェリヒア・コリK5株のbhsA-ycfS遺伝子を含む領域の塩基配列

配列番号 105 : エシェリヒア・コリK5株のBhsAタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 106 : エシェリヒア・コリK5株のYcfSタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 107 : エシェリヒア・コリK5株の *lepB-rnc-era* 遺伝子を含む領域の塩基配列

配列番号 108 : エシェリヒア・コリK5株の *LepB* タンパク質のアミノ酸配列

配列番号 109 : エシェリヒア・コリK5株の *Rnc* タンパク質のアミノ酸配列

配列番号 110 : エシェリヒア・コリK5株の *Era* タンパク質のアミノ酸配列

配列番号 111 : エシェリヒア・コリK5株の *dapA-gcvR-bcp-hyfA* 遺伝子を含む領域の塩基配列

配列番号 112 : エシェリヒア・コリK5株の *DapA* タンパク質のアミノ酸配列

配列番号 113 : エシェリヒア・コリK5株の *GcvR* タンパク質のアミノ酸配列

配列番号 114 : エシェリヒア・コリK5株の *Bcp* タンパク質のアミノ酸配列

配列番号 115 : エシェリヒア・コリK5株の *HyfA* タンパク質のアミノ酸配列

配列番号 116 : エシェリヒア・コリK5株の *rpoE-nadB-yfiC-srmB* 遺伝子を含む領域の塩基配列

配列番号 117 : エシェリヒア・コリK5株の *RpoE* タンパク質のアミノ酸配列

配列番号 118 : エシェリヒア・コリK5株の *NadB* タンパク質のアミノ酸配列

配列番号 119 : エシェリヒア・コリK5株の *YfiC* タンパク質のアミノ酸配列

配列番号 120 : エシェリヒア・コリK5株の *SrmB* タンパク質のアミノ酸配列

配列番号 121 : エシェリヒア・コリK5株の *g1414-g1413* 遺伝子を含む領域の塩基配列

配列番号 122 : エシェリヒア・コリK5株の *G1414* タンパク質のアミノ酸配列

配列番号 123 : エシェリヒア・コリK5株の *G1413* タンパク質のアミノ酸配列

配列番号 124 : エシェリヒア・コリK5株の *nuoEFG* 遺伝子を含む領域の塩基配列

配列番号 125 : エシェリヒア・コリK5株の *NuoE* タンパク質のアミノ酸配列

配列番号 126 : エシェリヒア・コリK5株の *NuoF* タンパク質のアミノ酸配列

配列番号 127 : エシェリヒア・コリK5株の *NuoG* タンパク質のアミノ酸配列

配列番号 128 : エシェリヒア・コリK5株の *g1mZ-hemYXD* 遺伝子を含む領域の塩基配列

配列番号 1 2 9 : エシェリヒア・コリK5株のHemYタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 1 3 0 : エシェリヒア・コリK5株のHemXタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 1 3 1 : エシェリヒア・コリK5株のHemDタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 1 3 2 : エシェリヒア・コリK5株のrImL遺伝子を含む領域の塩基配列

配列番号 1 3 3 : エシェリヒア・コリK5株のRImLタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 1 3 4 : エシェリヒア・コリK5株のartQMJ-rImC-ybj0遺伝子を含む領域の塩基配列

配列番号 1 3 5 : エシェリヒア・コリK5株のArtQタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 1 3 6 : エシェリヒア・コリK5株のArtMタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 1 3 7 : エシェリヒア・コリK5株のArtJタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 1 3 8 : エシェリヒア・コリK5株のRImCタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 1 3 9 : エシェリヒア・コリK5株のYbj0タンパク質のアミノ酸配列

配列番号 1 4 0 : エシェリヒア・コリK5株のyej0ML遺伝子を含む領域の塩基配列

配列番号 1 4 1 : エシェリヒア・コリK5株のYej0タンパク質のアミノ酸配列

配列番号 1 4 2 : エシェリヒア・コリK5株のYejMタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 1 4 3 : エシェリヒア・コリK5株のYejLタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 1 4 4 : エシェリヒア・コリK5株のrpoS-ygbNML遺伝子を含む領域の塩基配列

配列番号 1 4 5 : エシェリヒア・コリK5株のRpoSタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 1 4 6 : エシェリヒア・コリK5株のYgbNタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 1 4 7 : エシェリヒア・コリK5株のYgbMタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 1 4 8 : エシェリヒア・コリK5株のYgbLタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 1 4 9 : エシェリヒア・コリK5株のg3798-g3797-g3796-g3795-g3794-g3793-g3792遺伝子を含む領域の塩基配列

配列番号 1 5 0 : エシェリヒア・コリK5株のG3798タンパク質のアミノ酸配列

配列番号 1 5 1 : エシェリヒア・コリK5株のG3797タンパク質のアミノ酸配列

配列番号 1 5 2 : エシェリヒア・コリK5株のG3796タンパク質のアミノ酸配列

配列番号 1 5 3 : エシェリヒア・コリK5株のG3795タンパク質のアミノ酸配列

配列番号 1 5 4 : エシェリヒア・コリK5株のG3794タンパク質のアミノ酸配列

配列番号 1 5 5 : エシェリヒア・コリK5株のG3793タンパク質のアミノ酸配列

配列番号 1 5 6 : エシェリヒア・コリK5株のG3792タンパク質のアミノ酸配列

配列番号 1 5 7 : エシェリヒア・コリK5株のryjA-soxRS-yjcCB遺伝子を含む領域の塩基配列

配列番号 1 5 8 : エシェリヒア・コリK5株のSoxRタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 1 5 9 : エシェリヒア・コリK5株のSoxSタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 1 6 0 : エシェリヒア・コリK5株のYjcCタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 1 6 1 : エシェリヒア・コリK5株のYjcBタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 1 6 2 : エシェリヒア・コリK5株のefeU0遺伝子を含む領域の塩基配列

配列番号 1 6 3 : エシェリヒア・コリK5株のEfeUタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 1 6 4 : エシェリヒア・コリK5株のEfe0タンパク質のアミノ酸配列

配列番号 1 6 5 : 野生型nlpDプロモーター (Pnlp0) の塩基配列

配列番号 1 6 6、1 6 7 : プライマー

配列番号 1 6 8 : 変異型nlpDプロモーター (Pnlp8) の塩基配列

配列番号 1 6 9 : 変異型nlpDプロモーター (Pnlp8) を含むPaeI-SalI断片の塩基配列

配列番号 1 7 0 ~ 1 7 3 : プライマー

配列番号 1 7 4 : エシェリヒア・コリK5株のrpoE遺伝子の塩基配列

請求の範囲

- [請求項1] ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌であって、
 rpoE、rbsR、rbsK、rbsB、hsrA、glgB、glgX、micF、rcsD、rcsB、
 ybiX、ybiI、ybiJ、ybiC、ybiB、rfaH、nusG、pcoR、pcoS、pcoE、yhcN、yhcO、
 aaeB、aaeA、aaeX、g1455、alpA、g1453、yrbA、mlaB、mlaC、mlaD、mlaE、mlaF、
 yrbG、norW、ybjI、ybjJ、ybjK、rybB、yjjY、yjtD、thrL、thrA、thrB、fruA、
 psuK、ytfT、yjfF、fbp、yagU、paoA、paoB、gsiC、gsiD、yliE、irp2、irp1、
 bhsA、ycfS、lepB、rnc、era、dapA、gcvR、bcp、hyfA、nadB、yfiC、srmB、g1414、
 g1413、nuoE、nuoF、nuoG、glmZ、hemY、hemX、hemD、rlmL、artQ、artM、artJ、
 rlmC、ybjO、yejO、yejM、yejL、rpoS、ygbN、ygbM、ygbL、g3798、g3797、
 g3796、g3795、g3794、g3793、g3792、ryjA、soxR、soxS、yjcC、yjcB、efeU、
 およびefe0遺伝子からなる群より選択される1またはそれ以上の遺伝子の発現が増大するように改変されていることを特徴とする、細菌。
- [請求項2] 少なくともrpoE遺伝子の発現が増大するように改変されている、請求項1に記載の細菌。
- [請求項3] 少なくともrfaH遺伝子の発現が増大するように改変されている、請求項1に記載の細菌。
- [請求項4] さらに、rbsR、rbsK、rbsB、hsrA、glgB、glgX、micF、rcsD、rcsB、ybiX、ybiI、ybiJ、ybiC、ybiB、nusG、pcoR、pcoS、pcoE、yhcN、yhcO、aaeB、aaeA、aaeX、g1455、alpA、g1453、yrbA、mlaB、mlaC、mlaD、mlaE、mlaF、yrbG、norW、ybjI、ybjJ、ybjK、rybB、yjjY、yjtD、thrL、thrA、thrB、fruA、psuK、ytfT、yjfF、fbp、yagU、paoA、paoB、gsiC、gsiD、yliE、irp2、irp1、bhsA、およびycfS遺伝子からなる群より選択される1またはそれ以上の遺伝子の発現が増大するように改変されている、請求項3に記載の細菌。
- [請求項5] 前記遺伝子の発現が、該遺伝子のコピー数を高めること、及び／又

は該遺伝子の発現調節配列を改変することによって増大した、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の細菌。

[請求項6] エシェリヒア・コリである、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の細菌。

[請求項7] 前記rbsB遺伝子が、配列番号 29 の800～1690位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号 29 の800～1690位に示す塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記rbsK遺伝子が、配列番号 29 の1816～2745位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号 29 の1816～2745位に示す塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記rbsR遺伝子が、配列番号 29 の2749～3741位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号 29 の2749～3741位に示す塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記hsrA遺伝子が、配列番号 29 の3707～5134位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号 29 の3707～5134位に示す塩基配列の相補配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記glgB遺伝子が、配列番号 34 の989～3175位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号 34 の989～3175位に示す塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産

能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記glgX遺伝子が、配列番号34の3172～5145位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号34の3172～5145位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記rcsB遺伝子が、配列番号43の3312～3962位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号43の3312～3962位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記rcsD遺伝子が、配列番号43の623～3295位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号43の623～3295位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記micF遺伝子が、配列番号43の219～311位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号43の219～311位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記ybiX遺伝子が、配列番号37の718～1395位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号37の718～1395位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記ybiI遺伝子が、配列番号37の1469～1735位に示す塩基配列を

含むDNA、または、配列番号37の1469～1735位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記ybiJ遺伝子が、配列番号37の2000～2260位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号37の2000～2260位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記ybiC遺伝子が、配列番号37の2488～3574位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号37の2488～3574位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記ybiB遺伝子が、配列番号37の3715～4677位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号37の3715～4677位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記rfaH遺伝子が、配列番号46に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号46に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記nusG遺伝子が、配列番号48に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号48に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩

基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記pcoR遺伝子が、配列番号50の128～808位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号50の128～808位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記pcoS遺伝子が、配列番号50の805～2205位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号50の805～2205位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記pcoE遺伝子が、配列番号50の2423～2857位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号50の2423～2857位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記yhcN遺伝子が、配列番号54の63～326位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号54の63～326位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記yhc0遺伝子が、配列番号54の382～654位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号54の382～654位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するD

N A であり ;

前記aaeB遺伝子が、配列番号 5 4 の746～2713位に示す塩基配列の相補配列を含むD N A、または、配列番号 5 4 の746～2713位に示す塩基配列の相補配列と 9 0 %以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するD N A であり ;

前記aaeA遺伝子が、配列番号 5 4 の2719～3651位に示す塩基配列の相補配列を含むD N A、または、配列番号 5 4 の2719～3651位に示す塩基配列の相補配列と 9 0 %以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するD N A であり ;

前記aaeX遺伝子が、配列番号 5 4 の3659～3931位に示す塩基配列の相補配列を含むD N A、または、配列番号 5 4 の3659～3931位に示す塩基配列の相補配列と 9 0 %以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するD N A であり ;

前記g1455遺伝子が、配列番号 6 0 の568～1140位に示す塩基配列の相補配列を含むD N A、または、配列番号 6 0 の568～1140位に示す塩基配列の相補配列と 9 0 %以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するD N A であり ;

前記alpA遺伝子が、配列番号 6 0 の1226～1486位に示す塩基配列の相補配列を含むD N A、または、配列番号 6 0 の1226～1486位に示す塩基配列の相補配列と 9 0 %以上の同一性を有する塩基配列を含み、

且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記g1453遺伝子が、配列番号60の2389～2529位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号60の2389～2529位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記yrbA遺伝子が、配列番号64の977～1246位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号64の977～1246位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記mlaB遺伝子が、配列番号64の1391～1780位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号64の1391～1780位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記mlaC遺伝子が、配列番号64の1684～2319位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号64の1684～2319位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記mlaD遺伝子が、配列番号64の2338～2889位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号64の2338～2889位に示す

塩基配列の相補配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、
且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量
を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有す
る DNA であり；

前記 *mlaE* 遺伝子が、配列番号 64 の 2894～3676 位に示す塩基配列の
相補配列を含む DNA、または、配列番号 64 の 2894～3676 位に示す
塩基配列の相補配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、
且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量
を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有す
る DNA であり；

前記 *mlaF* 遺伝子が、配列番号 64 の 3684～4493 位に示す塩基配列の
相補配列を含む DNA、または、配列番号 64 の 3684～4493 位に示す
塩基配列の相補配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、
且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量
を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有す
る DNA であり；

前記 *yrbG* 遺伝子が、配列番号 64 の 4703～5680 位に示す塩基配列を
含む DNA、または、配列番号 64 の 4703～5680 位に示す塩基配列と
90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産
能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細
菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有する DNA であり；

前記 *norW* 遺伝子が、配列番号 72 の 1201～2334 位に示す塩基配列を
含む DNA、または、配列番号 72 の 1201～2334 位に示す塩基配列と
90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産
能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細
菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有する DNA であり；

前記 *ybjI* 遺伝子が、配列番号 74 の 117～932 位に示す塩基配列の相
補配列を含む DNA、または、配列番号 74 の 117～932 位に示す塩基

配列の相補配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有する DNA であり；

前記 ybjJ 遺伝子が、配列番号 74 の 932～2140 位に示す塩基配列の相補配列を含む DNA、または、配列番号 74 の 932～2140 位に示す塩基配列の相補配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有する DNA であり；

前記 ybjK 遺伝子が、配列番号 74 の 2224～2760 位に示す塩基配列を含む DNA、または、配列番号 74 の 2224～2760 位に示す塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有する DNA であり；

前記 rybB 遺伝子が、配列番号 74 の 2777～2855 位に示す塩基配列の相補配列を含む DNA、または、配列番号 74 の 2777～2855 位に示す塩基配列の相補配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有する DNA であり；

前記 yjjY 遺伝子が、配列番号 78 の 124～264 位に示す塩基配列を含む DNA、または、配列番号 78 の 124～264 位に示す塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有する DNA であり；

前記 yjtD 遺伝子が、配列番号 78 の 664～1350 位に示す塩基配列を含む DNA、または、配列番号 78 の 664～1350 位に示す塩基配列と

90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記thrL遺伝子が、配列番号78の1564～1629位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号78の1564～1629位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記thrA遺伝子が、配列番号78の1711～4173位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号78の1711～4173位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記thrB遺伝子が、配列番号78の4175～5107位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号78の4175～5107位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記fruA遺伝子が、配列番号84の897～2588位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号84の897～2588位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記psuK遺伝子が、配列番号84の3165～3953位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号84の3165～3953位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記ytfT遺伝子が、配列番号87の252～1277位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号87の252～1277位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記yjfF遺伝子が、配列番号87の1264～2259位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号87の1264～2259位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記fbp遺伝子が、配列番号87の2292～3290位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号87の2292～3290位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記yagU遺伝子が、配列番号91の117～731位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号91の117～731位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記paoA遺伝子が、配列番号91の1149～1838位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号91の1149～1838位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記paoB遺伝子が、配列番号91の1835～2791位に示す塩基配列を

含むDNA、または、配列番号91の1835～2791位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記gsiC遺伝子が、配列番号95の264～1184位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号95の264～1184位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記gsiD遺伝子が、配列番号95の1187～2098位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号95の1187～2098位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記yliE遺伝子が、配列番号95の2276～4624位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号95の2276～4624位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記irp2遺伝子が、配列番号100に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号100に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記irp1遺伝子が、配列番号102に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号102に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増

大させる性質を有するDNAであり；

前記bhsA遺伝子が、配列番号104の440～697位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号104の440～697位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記ycfS遺伝子が、配列番号104の779～1741位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号104の779～1741位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記lepB遺伝子が、配列番号107の1344～2318位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号107の1344～2318位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記rnc遺伝子が、配列番号107の2590～3270位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号107の2590～3270位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記era遺伝子が、配列番号107の3267～4172位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号107の3267～4172位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記dapA遺伝子が、配列番号111の858～1736位に示す塩基配列

の相補配列を含むDNA、または、配列番号111の858～1736位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記gcvR遺伝子が、配列番号111の1882～2454位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号111の1882～2454位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記bcp遺伝子が、配列番号111の2454～2924位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号111の2454～2924位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記hyfA遺伝子が、配列番号111の3177～3794位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号111の3177～3794位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記rpoE遺伝子が、配列番号116の355～930位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号116の355～930位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記nadB遺伝子が、配列番号116の1338～2960位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号116の1338～2960位に示す塩基配

列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有する DNA であり；

前記 yfiC 遺伝子が、配列番号 116 の 2945～3682 位に示す塩基配列の相補配列を含む DNA、または、配列番号 116 の 2945～3682 位に示す塩基配列の相補配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有する DNA であり；

前記 srmB 遺伝子が、配列番号 116 の 3814～5148 位に示す塩基配列を含む DNA、または、配列番号 116 の 3814～5148 位に示す塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有する DNA であり；

前記 g1414 遺伝子が、配列番号 121 の 28～699 位に示す塩基配列を含む DNA、または、配列番号 121 の 28～699 位に示す塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有する DNA であり；

前記 g1413 遺伝子が、配列番号 121 の 831～1157 位に示す塩基配列を含む DNA、または、配列番号 121 の 831～1157 位に示す塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有する DNA であり；

前記 nuoE 遺伝子が、配列番号 124 の 796～1296 位に示す塩基配列の相補配列を含む DNA、または、配列番号 124 の 796～1296 位に示す塩基配列の相補配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発

現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記nuoF遺伝子が、配列番号124の1293～2630位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号124の1293～2630位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記nuoG遺伝子が、配列番号124の2683～5409位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号124の2683～5409位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記glmZ遺伝子が、配列番号128の357～563位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号128の357～563位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記hemY遺伝子が、配列番号128の611～1807位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号128の611～1807位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記hemX遺伝子が、配列番号128の1810～2991位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号128の1810～2991位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に

同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記hemD遺伝子が、配列番号128の3013～3753位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号128の3013～3753位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記rlmL遺伝子が、配列番号132の571～2679位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号132の571～2679位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記artQ遺伝子が、配列番号134の386～1102位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号134の386～1102位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記artM遺伝子が、配列番号134の1102～1770位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号134の1102～1770位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記artJ遺伝子が、配列番号134の2061～2792位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号134の2061～2792位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記rlmC遺伝子が、配列番号134の2991～4118位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号134の2991～4118位に

示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記ybj0遺伝子が、配列番号134の4159～4647位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号134の4159～4647位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記yej0遺伝子が、配列番号140の216～2807位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号140の216～2807位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記yejM遺伝子が、配列番号140の3061～4821位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号140の3061～4821位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記yejL遺伝子が、配列番号140の4841～5068位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号140の4841～5068位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記rpoS遺伝子が、配列番号144の318～1310位に示す塩基配列

を含むDNA、または、配列番号144の318～1310位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記ygbN遺伝子が、配列番号144の1404～2768位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号144の1404～2768位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記ygbM遺伝子が、配列番号144の2857～3633位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号144の2857～3633位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記ygbL遺伝子が、配列番号144の3638～4276位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号144の3638～4276位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記g3798遺伝子が、配列番号149の615～1268位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号149の615～1268位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記g3797遺伝子が、配列番号149の1368～2219位に示す塩基配

列を含むDNA、または、配列番号149の1368～2219位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記g3796遺伝子が、配列番号149の2257～2748位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号149の2257～2748位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記g3795遺伝子が、配列番号149の3021～3203位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号149の3021～3203位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記g3794遺伝子が、配列番号149の3470～4051位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号149の3470～4051位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記g3793遺伝子が、配列番号149の4280～4480位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号149の4280～4480位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり

;

前記g3792遺伝子が、配列番号149の4520～4717位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号149の4520～4717位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり

;

前記ryjA遺伝子が、配列番号157の657～796位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号157の657～796位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり;

前記soxR遺伝子が、配列番号157の790～1254位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号157の790～1254位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり;

前記soxS遺伝子が、配列番号157の1340～1663位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号157の1340～1663位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり;

前記yjcC遺伝子が、配列番号157の1666～3252位に示す塩基配列の相補配列を含むDNA、または、配列番号157の1666～3252位に示す塩基配列の相補配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を

有するDNAであり；

前記yjcB遺伝子が、配列番号157の3682～3963位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号157の3682～3963位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記efeU遺伝子が、配列番号162の753～1583位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号162の753～1583位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAであり；

前記efe0遺伝子が、配列番号162の1641～2768位に示す塩基配列を含むDNA、または、配列番号162の1641～2768位に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、且つ、ヘパロサン生産能を有するエシェリヒア属細菌において発現量を増大させた際に同細菌のヘパロサン生産能を増大させる性質を有するDNAである、請求項1～6のいずれか1項に記載の細菌。

[請求項8] 請求項1～7のいずれか1項に記載の細菌を培地で培養し、ヘパロサンを該培地中に生成蓄積すること、および該培地よりヘパロサンを採取すること、を含むヘパロサンの製造法。

[請求項9] 請求項1～7のいずれか1項に記載の細菌を培地で培養し、ヘパロサンを該培地中に生成蓄積すること、該ヘパロサンを化学的および／または酵素的に処理してヘパリンを生産すること、および該ヘパリンを回収すること、を含むヘパリンの製造法。

[図1]

ネイティブプロモーターPnlp0 の配列

-35(Pnlp2) -10(Pnlp2)

aaaacgtgaggaaatacctggatttttcc**tggtta**ttttgccgcaggtcagcg**tatcgtg**

-35(Pnlp1) -10(Pnlp1) 転写開始点

aagatcttttccagtg**ttcagt**tagggtgccttgcacgg**taattat**gtcact**tggtt**attaa

M S

ccaatttttcctgggggataa**atg**agc

[図2]

変異型プロモーターPnlp8 の配列

-35(Pnlp2) -10(Pnlp2)

aaaacgtgaggaaatacctggatttttcc**tggtta**ttttgccgcaggtcagcg**tataatg**

-35(Pnlp1) -10(Pnlp1) 転写開始点

aagatcttttccagtg**ttgaca**agggtgccttgcacgg**tataat**gtcact**tggtt**attaa

M S

ccaatttttcctgggggataa**atg**agc

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/076357

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N1/21(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P19/04(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N1/21, C12N15/09, C12P19/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDREAMIII), Thomson Innovation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2011/0111458 A1 (KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD.), 12 May 2011 (12.05.2011), entire text; particularly, claims; table 1 & EP 2298880 A1 & WO 2009/116566 A1	1-3, 5-7
Y	ZHANG C. et al., Metabolic engineering of Escherichia coli BL21 for biosynthesis of heparosan, a bioengineered heparin precursor. Metabolic Engineering, 2012, Vol.14, pp.521-527 entire text, particularly, abstract, table 3	1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
10 December, 2014 (10.12.14)

Date of mailing of the international search report
22 December, 2014 (22.12.14)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/076357

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KANG M.J. et al., Identification of genes affecting lycopene accumulation in Escherichia coli using a shot-gun method. Biotechnology and Bioengineering, 2005, Vol.91, pp.636-642 entire text, particularly, abstract, page 637, left column, 2nd paragraph to page 638, left column, 2nd paragraph, fig. 2	1-9
A	SANTOS C.N.S. et al., Rational, combinatorial, and genomic approaches for engineering L-tyrosine production in Escherichia coli. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 2012, Vol.109, No.34, pp.13538-13543	1-9
A	BAILEY M.J.A. et al., RfaH and the <i>ops</i> element, components of a novel system controlling bacterial transcription elongation. Molecular Microbiology, 1997, Vol.26, No.5, pp.845-851	1-9
A	WO 2010/136435 A1 (ALTERGON S.A.), 02 December 2010 (02.12.2010), & US 2012/0135470 A1 & EP 2435578 A & CN 102459625 A	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/076357

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claim 1 describes bacteria belonging to the genus *Escherichia* that are capable of producing heparosan and have been genetically modified so as to increase the expression of one or more genes selected from the group consisting of 106 kinds of genes including rpoE, etc. Thus, it appears that at least 106 kinds of genetically modified bacteria belonging to the genus *Escherichia* are described therein.

(Continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/076357

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

The matter common to these 106 kinds of bacteria belonging to the genus *Escherichia* is "a bacterium belonging to the genus *Escherichia* that has been genetically modified with respect to one or more genes so as to enhance the capability of producing heparosan". However, this matter is disclosed in document 2 and, therefore, cannot be considered as a special technical feature.

It does not appear that there are the same or corresponding special technical features, other than the one described above, among these 106 kinds of bacteria belonging to the genus *Escherichia*.

Accordingly, it is considered that one hundred and six inventions are set forth in claim 1.

This opinion may be also applied to claims 2-9 referring to claim 1.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N1/21(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P19/04(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N1/21, C12N15/09, C12P19/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 4 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 4 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 4 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)、JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamIII)、Thomson Innovation

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	US 2011/0111458 A1 (KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD.) 2011.05.12 & EP 2298880 A1 & WO 2009/116566 A1 全文、特に、請求項、表 1	1-3, 5-7

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 0 . 1 2 . 2 0 1 4

国際調査報告の発送日

2 2 . 1 2 . 2 0 1 4

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官（権限のある職員）

伊達 利奈

4 B

3 9 6 0

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	ZHANG C. et al., Metabolic engineering of Escherichia coli BL21 for biosynthesis of heparosan, a bioengineered heparin precursor. Metabolic Engineering, 2012, Vol.14, pp.521-527 全文、特に、要約、表 3	1-9
Y	KANG M.J. et al., Identification of genes affecting lycopene accumulation in Escherichia coli using a shot-gun method. Biotechnology and Bioengineering, 2005, Vol.91, pp.636-642 全文、特に、要約、第 6 3 7 頁左欄第 2 段落—第 6 3 8 頁左欄第 2 段落、図 2	1-9
A	SANTOS C.N.S. et al., Rational, combinatorial, and genomic approaches for engineering L-tyrosine production in Escherichia coli. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 2012, Vol.109, No.34, pp.13538-13543	1-9
A	BAILEY M.J.A. et al., RfaH and the <i>ops</i> element, components of a novel system controlling bacterial transcription elongation. Molecular Microbiology, 1997, Vol.26, No.5, pp.845-851	1-9
A	WO 2010/136435 A1 (ALTERGON S.A.) 2010.12.02 & US 2012/0135470 A1 & EP 2435578 A & CN 102459625 A	1-9

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求項1には、ヘパロサン産生能を有するエシェリヒア属細菌であって、rpoE等を含む106種類の遺伝子からなる群より選択される1又はそれ以上の遺伝子の発現が増大するように改変されたエシェリヒア属細菌が記載されているため、少なくとも106種類の遺伝子改変されたエシェリヒア属細菌群が記載されていると認められる。

これら106種類のエシェリヒア属細菌に共通する事項は、「ヘパロサン産生能を向上させるように1以上の遺伝子について改変されているエシェリヒア属細菌」であるが、当該事項は文献2に開示されているため、特別な技術的特徴であるとは認められない。また、これら106種類のエシェリヒア属細菌の間に、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

したがって、請求項1には106の発明が記載されていると認められる。請求項1を引用する請求項2-9についても同様である。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。