

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2015-156844

(P2015-156844A)

(43) 公開日 平成27年9月3日(2015.9.3)

(51) Int.Cl.

C 12 N 15/09 (2006.01)
C 12 N 1/21 (2006.01)
C 12 P 13/00 (2006.01)

F 1

C 12 N 15/00
C 12 N 1/21
C 12 P 13/00

A

テーマコード(参考)

4 B 0 2 4

4 B 0 6 4

4 B 0 6 5

審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 30 頁)

(21) 出願番号

特願2014-34291 (P2014-34291)

(22) 出願日

平成26年2月25日 (2014. 2. 25)

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

(71) 出願人 000000918

花王株式会社

東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番1
0号

(74) 代理人 110000084

特許業務法人アルガ特許事務所

(74) 代理人 100077562

弁理士 高野 登志雄

(74) 代理人 100096736

弁理士 中嶋 俊夫

(74) 代理人 100117156

弁理士 村田 正樹

(74) 代理人 100111028

弁理士 山本 博人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】枯草菌変異株及びそれを用いたジピコリン酸の製造方法

(57) 【要約】

【課題】ジピコリン酸を高生産することができる組換え微生物の提供。

【解決手段】prophage 6領域、prophage 1領域、prophage 4領域、PBSX領域、prophage 5領域、prophage 3領域、spb領域、pks領域、skin領域、pps領域、prophage 2領域、ydcL-ydeK-ydhU領域、ysisB-yiTD領域、yunA-yurt領域、cgeE-ypmQ領域、yeeK-yesX領域、pdP-rocr領域、ycxB-sipU領域、SKIN-PRO7領域、sbo-ywhH領域、yybP-yyaJ領域及びyncM-fosB領域からなる群より選択される1以上の領域が欠失したゲノムを有し、且つ枯草菌ジピコリン酸シンターゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子の発現と、枯草菌ビルビン酸力ルボキシラーゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子の発現とが強化された枯草菌変異株。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

枯草菌変異株であって、

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

10

枯草菌ジピコリン酸シンターゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子の発現と、枯草菌ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子の発現とが強化された、枯草菌変異株。

【請求項 2】

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

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

(a) 配列番号 3 に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

20

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

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

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

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

30

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

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

(j) 配列番号 5 に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

40

(k) 配列番号 5 に示すヌクレオチド配列と 80 % 以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、且つ (i) に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(l) 配列番号 5 に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドの相補鎖に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つ (i) に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(m) 配列番号 6 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(n) 配列番号 6 に示すアミノ酸配列において 1 又は複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、且つ (i) に記載の遺伝子がコードするタ

50

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

(o) 配列番号 6 に示すアミノ酸配列と 80 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ(i)に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 3】

前記枯草菌ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子が、下記(p)～(u)からなる群より選択される少なくとも 1 つである、請求項 1 又は 2 記載の枯草菌変異株：

(p) 配列番号 1 に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド； 10

(q) 配列番号 1 に示すヌクレオチド配列と 80 % 以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、且つピルビン酸カルボキシラーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(r) 配列番号 1 に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドの相補鎖に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つピルビン酸カルボキシラーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

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

(t) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列において 1 又は複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、且つピルビン酸カルボキシラーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド； 20

(u) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列と 80 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つピルビン酸カルボキシラーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 4】

前記枯草菌ジピコリン酸シンターゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子が、枯草菌 s p o V F A 遺伝子及び枯草菌 s p o V F B 遺伝子からなる群より選択される少なくとも 1 つである、請求項 1～3 のいずれか 1 項記載の枯草菌変異株。

【請求項 5】

前記枯草菌ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子が、枯草菌 p y c A 遺伝子である、請求項 1～4 のいずれか 1 項記載の枯草菌変異株。 30

【請求項 6】

枯草菌変異株の製造方法であって、

prophage 6 領域、prophage 1 領域、prophage 4 領域、PBS 領域、prophage 5 領域、prophage 3 領域、spb 領域、pks 領域、skin 領域、pps 領域、prophage 2 領域、ydcL-ydeK-ydhU 領域、yisB-yitD 領域、yunA-yurT 領域、cgeE-ypmQ 領域、yeek-yesX 領域、pdprrocR 領域、ycxB-sipU 領域、SKIN-Pr07 領域、sbo-ywhH 領域、yybP-yyaJ 領域及びyncM-fosB 領域からなる群より選択される 1 以上の領域が欠失したゲノムを有する枯草菌変異株において、枯草菌ジピコリン酸シンターゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子の発現と、枯草菌ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子の発現とを強化することを含む、方法。 40

【請求項 7】

前記枯草菌ジピコリン酸シンターゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子が、下記(i)及び(ii)に記載の遺伝子からなる群より選択される少なくとも 1 つである、請求項 6 記載の方法：

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

(a) 配列番号 3 に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド； 50

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

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

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

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

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

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

(j) 配列番号5に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

(k) 配列番号5に示すヌクレオチド配列と80%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、且つ(i)に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(l) 配列番号5に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドの相補鎖に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つ(i)に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(m) 配列番号6に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(n) 配列番号6に示すアミノ酸配列において1又は複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、且つ(i)に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(o) 配列番号6に示すアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ(i)に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項8】

前記枯草菌ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子が、下記(p)～(u)からなる群より選択される少なくとも1つである、請求項6又は7記載の方法：

(p) 配列番号1に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

(q) 配列番号1に示すヌクレオチド配列と80%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、且つピルビン酸カルボキシラーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(r) 配列番号1に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドの相補鎖に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つピルビン酸カルボキシラーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

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

(t) 配列番号2に示すアミノ酸配列において1又は複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、且つピルビン酸カルボキシラーゼ活性を有

10

20

30

40

50

するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(u) 配列番号2に示すアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つピルビン酸カルボキシラーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項9】

前記枯草菌ジピコリン酸シンターゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子が、枯草菌s p o V F A 遺伝子及び枯草菌s p o V F B 遺伝子からなる群より選択される少なくとも1つである、請求項6～8のいずれか1項記載の方法。

【請求項10】

前記枯草菌ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子が、枯草菌p y c A 遺伝子である、請求項6～9のいずれか1項記載の方法。

【請求項11】

請求項1～5のいずれか1項記載の枯草菌変異株を用いるジピコリン酸又はその塩の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

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

【背景技術】

【0002】

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

【0003】

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

【0004】

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

【0005】

また、遺伝子工学的に改変した微生物を用いたジピコリン酸の製造方法が知られている。特許文献4には、遺伝子組換えリジン生産菌を利用したジピコリン酸の製造方法が開示されている。特許文献5には、ジピコリン酸合成経路に関する遺伝子の発現パターンを改変したバシラス(Bacillus)属又はクロストリジウム(Clostridium)属微生物を利用したジピコリン酸の製造方法が開示されている。

【0006】

特許文献6には、ゲノムの大領域を欠失させて得られた枯草菌変異株が、プロテアーゼ等の酵素の生産性に優れていることが記載されている。特許文献7には、L-グルタミン酸生産能を有するコリネ型細菌の細胞内のピルビン酸カルボキシラーゼ活性を増強することによる、効率のよいL-グルタミン酸の製造方法が開示されている。しかし、これらの

10

20

30

40

50

変異微生物は、酵素又はL-グルタミン酸の生産のために開発された株である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】特開2004-275075号公報

【特許文献2】獨国特許第2300056号公報

【特許文献3】米国特許第3334021号公報

【特許文献4】特開2002-371063号公報

【特許文献5】特開2008-048732号公報

【特許文献6】特開2007-130013号公報

【特許文献7】特開2000-201692号公報

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

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

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、DPAを効率良く生産することができる微生物株の開発を進めた。その結果、本発明者らは、ゲノムの大領域が欠失した枯草菌変異株において、枯草菌ジピコリン酸シンターゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子の発現と、枯草菌ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子の発現とを強化することにより得られた枯草菌変異株が、高いDPA生産能を有することを見出し、本発明を完成した。

20

【0010】

すなわち本発明は、一態様において、以下を提供する：

枯草菌変異株であって、

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

30

枯草菌ジピコリン酸シンターゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子の発現と、枯草菌ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子の発現とが強化された、枯草菌変異株。

【0011】

別の態様において、本発明は以下を提供する：

枯草菌変異株の製造方法であって、

prophage 6領域、prophage 1領域、prophage 4領域、PBS X領域、prophage 5領域、prophage 3領域、spb領域、pks領域、skin領域、pps領域、prophage 2領域、ydcL-ydeK-ydhU領域、yisB-yitD領域、yunA-yurt領域、cgeE-ypmQ領域、yeek-yesX領域、pdp-rocR領域、ycxB-sipU領域、SKIN-Pr07領域、sbo-ywhH領域、yybP-yyaJ領域及びyncM-fosB領域からなる群より選択される1以上の領域が欠失したゲノムを有する枯草菌変異株において、枯草菌ジピコリン酸シンターゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子の発現と、枯草菌ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子の発現とを強化することを含む、方法。

40

50

【0012】

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

【発明の効果】

【0013】

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

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】枯草菌のゲノム上から所定の領域を欠失させる方法の一例を示す模式図。 10

【図2】枯草菌ゲノムから外来薬剤耐性遺伝子を除去する手順を示す模式図。

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

【図4】枯草菌変異株へのビルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子の導入手順及び導入位置に関する一実施形態を示す模式図。

【発明を実施するための形態】

【0015】

(1. 定義)

本明細書に記載の枯草菌の各遺伝子及びゲノム領域の名称は、JAFAN: Japan Functional Analysis Network for *Bacillus subtilis* (BSORF DB) でインターネット公開 ([bacillus.genome.ad.jp/])、2006年1月18日更新) された枯草菌ゲノムデータに基づいて記載されている。 20

【0016】

本明細書において、アミノ酸配列及びヌクレオチド配列の同一性はLipman-Pearson法 (Lipman, D.J., Pearson, W.R.: Science, 1985, 227: 1435-1441) によって計算される。具体的には、遺伝情報処理ソフトウェアGenetyx-Win (ソフトウェア開発) のホモロジー解析 (Search homology) プログラムを用いて、Unit size to compare (k t u p) を2として解析を行うことにより算出される。 30

【0017】

本明細書において、別途定義されない限り、アミノ酸配列又はヌクレオチド配列におけるアミノ酸又はヌクレオチドの欠失、置換、付加又は挿入に関して使用される「1又は数個」とは、例えば、1~12個、好ましくは1~8個、より好ましくは1~4個であり得る。また本明細書において、アミノ酸又はヌクレオチドの「付加」には、配列の一末端及び両末端への1~数個のアミノ酸又はヌクレオチドの付加が含まれる。

【0018】

本明細書において、ハイブリダイゼーションに関する「ストリンジエントな条件」とは、配列同一性が約80%以上若しくは約90%以上のヌクレオチド配列を有する遺伝子の確認を可能にする条件である。「ストリンジエントな条件」としては、Molecular Cloning - A LABORATORY MANUAL THIRD EDITIION (Joseph Sambrook, David W. Russell, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001) 記載の条件が挙げられる。ハイブリダイゼーションの当業者は、プローブのヌクレオチド配列や濃度、長さ等に応じて、ハイブリダイゼーション溶液の塩濃度、温度等を調節することにより、ストリンジエントな条件を適切に作り出すことができる。一例を示せば、上記「ストリンジエントな条件」とは、ハイブリダイゼーション条件としては、5×SSC、70以上が好ましく、5×SSC、85以上がより好ましく、洗浄条件としては、1×SSC、60以上が好ましく、1×SSC、73以上がより好ましい。上記SSC及び温度条件の組み合わせは例示であり、当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリ 40

ンジエンシーを決定する上記若しくは他の要素を適宜組み合わせることにより、適切なストリンジエンシーを実現することが可能である。

【0019】

本明細書において、遺伝子の上流及び下流とは、それぞれ、対象として捉えている遺伝子又は領域の5'側及び3'側に続く領域を示す。別途定義されない限り、遺伝子の上流及び下流とは、遺伝子の翻訳開始点からの上流領域及び下流領域には限定されない。

【0020】

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

10

【0021】

本明細書において、目的遺伝子の発現強化とは、改変前に比較して目的遺伝子の発現量を増加させることである。目的遺伝子の発現量を増加させる手段としては、例えば、野生型に比較し発現を強化できる制御領域（強制御領域）の制御下に目的遺伝子を配置すること、強発現制御領域の制御下に配置された目的遺伝子を細胞内のゲノム中若しくはプラスミド中に導入すること、又は複数の目的遺伝子を細胞内に作動可能に存在させる改変などが挙げられる。複数の目的遺伝子を細胞内に作動可能に存在させる改変としては、目的遺伝子が作動可能に存在する細胞内に、さらに目的遺伝子を必要に応じて制御領域と共に細胞内のゲノム中若しくはプラスミド中に導入すること、又は複数個の目的遺伝子を、必要に応じて制御領域と共に細胞内のゲノム中若しくはプラスミド中に導入することによって、細胞内で発現する目的遺伝子の数の増加させる改変を挙げることができる。

20

【0022】

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

30

【0023】

本明細書において、ジピコリン酸シンターゼ活性とは、下記式(1)に示すジヒドロジピコリン酸からのジピコリン酸の合成反応を触媒する活性である。また本明細書において、ピルビン酸カルボキシラーゼ活性とは、下記式(2)に示すピルビン酸からオキサロ酸への転換反応を触媒する活性である。

40

【0024】

(2. 本発明の枯草菌変異株の製造)

(2-1. ゲノム欠失枯草菌変異株)

本発明の枯草菌変異株は、枯草菌野生株のゲノム上の大領域が欠失したゲノムを有し、且つ枯草菌ジピコリン酸シンターゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子の発現と、枯草菌ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子の発現とが強化された、枯草菌変異株である。好ましくは、本発明の枯草菌変異株は、該ゲノムの大領域が欠失した枯草菌変異株に対して、枯草菌ジピコリン酸シンターゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子の発現と、枯草菌ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子の発現とを強化する改変を加えることによって作製される。

【0025】

50

上記ゲノムの大領域が欠失した枯草菌変異株は、枯草菌野生株 (*Bacillus subtilis* Marbburg No.168；本明細書において以下、枯草菌 168 株又は単に 168 株、あるいは野生株と称する) のゲノムと比べて、そのゲノム中の大領域が欠失したゲノムを有する。すなわち、当該枯草菌変異株のゲノムにおいては、枯草菌野生株のゲノム中の、*prophage 6* (*y o a V - y o b O*) 領域、*prophage 1* (*y b b U - y b d E*) 領域、*prophage 4* (*y j c M - y j d J*) 領域、*PBSX* (*y k d A - x l y A*) 領域、*prophage 5* (*y n x B - d u t*) 領域、*prophage 3* (*y d i M - y d j C*) 領域、*spb* (*y o d U - y p q P*) 領域、*pk s* (*pk s A - y m a C*) 領域、*skin* (*spo I V C B - spo I I I C*) 領域、*pps* (*pps E - p p s A*) 領域、*prophage 2* (*y d c L - y d e J*) 領域、*y d c L - y d e K - y d h U* 領域、*y i s B - y i t D* 領域、*y u n A - y u r T* 領域、*c g e E - y p m Q* 領域、*y e e K - y e s X* 領域、*p d p - r o c R* 領域、*y c x B - s i p U* 領域、*SKIN - Pro 7* (*spo I V C B - y r a K*) 領域、*s b o - y w h H* 領域、*y y b P - y y a J* 領域及び*y n c M - f o s B* 領域からなる群より選択される 1 以上の領域が欠失している。好ましくは、当該枯草菌変異株は、枯草菌野生株のゲノム中の、*prophage 6* (*y o a V - y o b O*) 領域、*prophage 1* (*y b b U - y b d E*) 領域、*prophage 4* (*y j c M - y j d J*) 領域、*PBSX* (*y k d A - x l y A*) 領域、*prophage 5* (*y n x B - d u t*) 領域、*prophage 3* (*y d i M - y d j C*) 領域、*spb* (*y o d U - y p q P*) 領域、*pk s* (*pk s A - y m a C*) 領域、*skin* (*spo I V C B - spo I I I C*) 領域、*pps* (*pps E - p p s A*) 領域、*prophage 2* (*y d c L - y d e J*) 領域、*y d c L - y d e K - y d h U* 領域、*y i s B - y i t D* 領域、*y u n A - y u r T* 領域、*c g e E - y p m Q* 領域、*y e e K - y e s X* 領域、*p d p - r o c R* 領域、*y c x B - s i p U* 領域、*SKIN - Pro 7* (*spo I V C B - y r a K*) 領域、*s b o - y w h H* 領域、*y y b P - y y a J* 領域及び*y n c M - f o s B* 領域の全てを欠失している。このような枯草菌変異株の例としては、特開 2007-130013 号公報に記載の枯草菌 MGB874 株が挙げられる。

【0026】

上記枯草菌変異株は、例えば、168 株等の任意の枯草菌株から上述のゲノム領域を欠失させることによって作製することができる。欠失させるべき目的のゲノム領域は、例えば、当該任意の枯草菌株のゲノムを、公開されている枯草菌 168 株のゲノムと対比することにより決定することができる。枯草菌 168 株の全ヌクレオチド配列及びゲノムの情報は、上述の B S O R F D B、又は G e n B a n k : A L 0 0 9 1 2 6 . 2 ([www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/38680335]) から入手することができる。当業者は、これらの情報源から得た枯草菌 168 株のゲノム情報に基づいて、欠失させるべき目的のゲノム領域を決定することができる。ここで、欠失させるべきゲノム領域は、公開されている枯草菌 168 株における上述のゲノム領域のヌクレオチド配列に対して、1 又は数個 (例えば、1 ~ 100 個、好ましくは 1 ~ 50 個、より好ましくは 1 ~ 30 個、さらに好ましくは 1 ~ 10 個、さらにより好ましくは 1 ~ 5 個) のヌクレオチドにおける天然又は人工的に引き起こされた欠失、置換、挿入、付加等の変異を含むヌクレオチド配列を有するゲノム領域であり得る。あるいは、欠失させるべきゲノム領域は、公開されている枯草菌 168 株における上述のゲノム領域に対して、ヌクレオチド配列において好ましくは 80 % 以上同一、さらにより好ましくは 90 % 以上同一、なお好ましくは 95 % 以上同一なゲノム領域であり得る。

【0027】

あるいは、上記欠失させるべきゲノム領域は、表 1 に示す一対のオリゴヌクレオチドセットにより挟み込まれる領域として表すことができる。表 1 記載の領域を枯草菌ゲノム上から欠失させる方法としては、特に限定されないが、例えば S O E - P C R 法 (*s p l i c i n g b y o v e r l a p e x t e n s i o n P C R* : *Gene*, 1989, 77 : 61 - 68) 等により調製された欠失用 D N A 断片を用いた 2 重交差法が挙げられる。当該方法により枯草菌野生株から所定のゲノム領域が欠失した変異株を作製する手順

10

20

30

40

50

は、特開2007-130013号公報に詳述されているが、以下に概要を説明する。

【0028】

【表1】

領域	オリゴヌクレオチドセット			
	第1オリゴヌクレオチド	配列番号	第2オリゴヌクレオチド	配列番号
prophage6 (yoaV-yobO) 領域	tgcgtatgtgcgggatt	配列番号37	ACGCCACATTCTGTGTG	配列番号38
prophage1 (ybbU-ybdE) 領域	taagattatctaaagggttg	配列番号39	CATACAAGACGGAAATT	配列番号40
prophage4 (yjcM-yjdJ) 領域	ttattaaagtgcggaaaggca	配列番号41	TGCAAAAGAGGCCACACA	配列番号42
PBSX (ykdA-xlA) 領域	gacctgcaagtgcgtgat	配列番号43	GATCTTCTCTTCTGTCG	配列番号44
prophage5 (ynxB-dut) 領域	ccataattacgttggaaatct	配列番号45	AATCACACAGCATGGAGA	配列番号46
prophage3 (ydiM-ydjC) 領域	agcgatgtgaggtggaaaatt	配列番号47	TTATTAAAGTCTACAAAT	配列番号48
spb (yodU-ypaP) 領域	atgtcattaaatatcagtaca	配列番号49	GTTCACAGGAGATAACAGC	配列番号50
pks (pksA-ymaC) 領域	atcagaggaaggtaataatg	配列番号51	CATTCTGTTTCCAATTGT	配列番号52
skin (spoIVCB-spoIIIC) 領域	catactttgtggaggtgac	配列番号53	GAGATCCGGCTTCTTCTG	配列番号54
pps (ppsE-ppsA) 領域	cctcttattatgagaactgg	配列番号55	CTCTGTCCGCTAATCCGC	配列番号56
prophage2 (ydcL-ydeJ) 領域	gcccacaaaactgcccactta	配列番号57	TCTCTATCTATTCCATGGT	配列番号58
ydcL-ydeK-ydhU 領域	gcccacaaaactgcccactta	配列番号59	GGGCAATCCGTGGAACGGGT	配列番号60
yisB-yitD 領域	gatgttaagggaggagcggat	配列番号61	CGACGAGAGCCCCGCAGCCG	配列番号62
yunA-yurt 領域	aaatttctcgacaaggaa	配列番号63	TCGAAGGAGGGAAAAACAGT	配列番号64
cgeE-ypmQ 領域	ggtttgcgaaacgcctatt	配列番号65	GGCTGAAAGGATGGATGTC	配列番号66
yeek-yesX 領域	atgtgaaggagagagataat	配列番号67	CGTCTTATCCCTTAGTCCTC	配列番号68
pdp-rocR 領域	ggcgcccttcgcctccgcggc	配列番号69	GATCAGGCTTCCTGCTCCGG	配列番号70
ycxB-sipU 領域	atataaaaggatcagcactg	配列番号71	CCATGTTCTTTTGATTGC	配列番号72
SKIN-Pro7 (spoIVCB-yraK) 領域	catactttgtggaggtgac	配列番号73	CATTCTGTTTCCAATTGT	配列番号74
sbo-ywhH 領域	gggaggattcaattatgaaa	配列番号75	GACGATGTCTGGATGTTTTT	配列番号76
yybP-yyaJ 領域	ccgcgtcgggatgcctttc	配列番号77	GCAGATCCGCACTGACTTTT	配列番号78
yncM-fosB 領域	gcggcttttgcgtcgt	配列番号79	CCTTATATGAAATATGGTTG	配列番号80

【0029】

S O E - P C R 法による欠失用 D N A 断片の調製と当該欠失用 D N A 断片を用いた 2 重交差法による目的領域の欠失の手順の概要を図 1 に示す。初めに、S O E - P C R 法により、欠失させるべき目的領域の上流に隣接する約 0 . 1 ~ 3 k b 領域に対応する断片（上流断片と称する）と、同じく下流に隣接する約 0 . 1 ~ 3 k b 領域に対応する断片（下流断片と称する）とを連結した D N A 断片を調製する。好ましくは、目的領域の欠失を確認するために、当該上流断片と下流断片の間に薬剤耐性遺伝子などのマークー遺伝子断片をさらに連結した D N A 断片を調製する。

【0030】

まず、1回目の P C R によって、欠失させるべき領域の上流断片 A 及び下流断片 B 、並びに必要に応じてマークー遺伝子断片（図 1 中では、クロラムフェニコール耐性遺伝子断片 C m ）の 3 断片を調製する。上流断片及び下流断片の P C R 増幅の際には、後に連結される断片の末端 1 0 ~ 3 0 ヌクレオチドの配列を付加したプライマーを使用する。例えば、上流断片 A 、薬剤耐性マークー遺伝子断片 C m 、及び下流断片 B をこの順で連結する場合、上流断片 A の下流末端に結合するプライマーの 5 ' 末端に、薬剤耐性マークー遺伝子断片 C m の上流側 1 0 ~ 3 0 ヌクレオチドに相当する配列を付加し（図 1 、プライマー D R 1 ）、また下流断片 B の上流末端に結合するプライマーの 5 ' 末端に、薬剤耐性マークー遺伝子断片 C m の下流側 1 0 ~ 3 0 ヌクレオチドに相当する配列を付加する（図 1 、プライマー D F 2 ）。このように設計したプライマーセットを用いて上流断片 A 及び下流断片 B を P C R で増幅した場合、増幅された上流断片 A ' の下流側には薬剤耐性マークー遺伝子断片 C m の上流側に相当する領域が付加されることとなり、増幅された下流断片 B ' の上流側には薬剤耐性マークー遺伝子断片 C m の下流側に相当する領域が付加されることとなる。

【0031】

次に、1回目の P C R で調製した上流断片 A ' 、薬剤耐性マークー遺伝子断片 C m 、及び下流断片 B ' を混合して鑄型とし、上流断片の上流側に結合するプライマー（図 1 、プライマー D F 1 ）及び下流断片の下流側に結合するプライマー（図 1 、プライマー D R 2

10

20

30

40

50

) からなる 1 対のプライマーを用いて 2 回目の P C R を行う。この 2 回目の P C R により、上流断片 A、薬剤耐性マークー遺伝子断片 C m、及び下流断片 B をこの順で結合した欠失用 D N A 断片 D を増幅することができる。

【 0 0 3 2 】

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

【 0 0 3 3 】

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

10

【 0 0 3 4 】

次に、得られた形質転換体から、ゲノム D N A に挿入された上記マークー遺伝子を除去する。除去の手順としては、特に限定されないが、図 2 に示すような 2 段階相同組換え法を用いることができる(特開平 2 0 0 9 - 2 5 4 3 5 0 号公報)。当該方法では、初めに第 1 相同組換えのための D N A 断片(供与体 D N A)を調製する。調製の方法としては、特に限定されないが、上述した S O E - P C R 法等が挙げられる。供与体 D N A としては、例えば、除去すべきマークー遺伝子領域(すなわち、欠失された領域)の上流に隣接する領域に対応する約 0 . 1 ~ 3 k b 断片(上流断片)及び同じく下流に隣接する領域に対応する約 0 . 1 ~ 3 k b 断片(下流断片)が結合した断片と、当該除去すべきマークー遺伝子下流領域の断片とが連結した D N A 断片を用いることができる。好適には、当該下流断片と除去すべき第 1 のマークー遺伝子下流領域断片との間に、相同組換えの指標となる第 2 のマークー遺伝子等が挿入された D N A 断片が用いられる(図 2 を参照)。

20

【 0 0 3 5 】

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

30

【 0 0 3 6 】

ゲノム内相同組換えを起こした形質転換体を選択する手段としては、第 1 のマークー遺伝子が薬剤耐性遺伝子の場合は、薬剤耐性を持たない菌を選択する方法が挙げられる。ペニシリン系抗生物質は、増殖細胞に対して殺菌的に作用するが非増殖細胞には作用しない。したがって、薬剤とペニシリン系抗生物質の存在下で菌を培養すれば、薬剤存在下で増

40

50

殖しない薬剤非耐性菌を選択的に濃縮することができる (Methods in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Labs, 1970)。別の手段としては、致死遺伝子を導入する方法が挙げられる。例えば、上記第2のマークとしてchpA遺伝子等の致死遺伝子を菌に導入すれば、ゲノム内相同組換えが起こらなかった菌は当該致死遺伝子の作用で死滅するので、ゲノム内相同組換えを起こした形質転換体を選択することができる。選択された菌株からゲノムDNAを抽出し、これを鋳型としてPCRを行うことで、目的の領域が欠失されていることを確認することができる (特開2009-254350号公報)。

【0037】

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

10

【0038】

(2-2. ジピコリン酸シンターゼ遺伝子発現強化)

次いで、上記所定の領域を欠失した枯草菌変異株において、枯草菌ジピコリン酸シンターゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子の発現を強化する。

【0039】

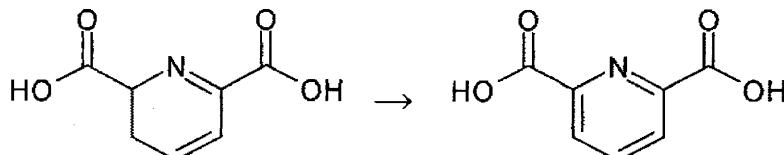
本明細書において、ジピコリン酸シンターゼ遺伝子とは、下記式(1)の化学反応を進行させる活性を有するジピコリン酸シンターゼをコードする遺伝子である。

【0040】

【化1】

20

式(1)



【0041】

30

ジピコリン酸シンターゼは、サブユニットAとサブユニットBから構成されており、それぞれのサブユニットをコードする遺伝子が存在する。枯草菌ジピコリン酸シンターゼ遺伝子としては、ジピコリン酸シンターゼ・サブユニットAをコードするspovFAと、ジピコリン酸シンターゼ・サブユニットBをコードするspovFBが挙げられる。枯草菌spovFA遺伝子のヌクレオチド配列及び当該spovFA遺伝子によりコードされるジピコリン酸シンターゼ・サブユニットAのアミノ酸配列をそれぞれ配列番号3及び4に示す。また、枯草菌spovFB遺伝子のヌクレオチド配列及び当該spovFB遺伝子によりコードされるジピコリン酸シンターゼ・サブユニットBのアミノ酸配列をそれぞれ配列番号5及び6に示す。

【0042】

40

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

【0043】

あるいは、枯草菌ジピコリン酸シンターゼ遺伝子に相当する遺伝子としては、枯草菌spovFB遺伝子と少なくとも80%、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以

50

上、より好ましくは95%以上、より好ましくは96%以上、より好ましくは97%以上、より好ましくは98%以上、より好ましくは99%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、且つ枯草菌ジピコリン酸シンターゼ・サブユニットAとともに働いて上述したジピコリン酸合成反応を触媒する活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチドが挙げられる。

【0044】

さらに、枯草菌ジピコリン酸シンターゼ遺伝子に相当する遺伝子としては、枯草菌以外の微生物由来のジピコリン酸シンターゼ・サブユニットA又はBをコードする遺伝子が挙げられる。そのような遺伝子の例としては、*Bacillus licheniformis*由来のsp o VFA (配列番号7) 及びsp o VFB (配列番号8) 、*Bacillus clausii*由来のsp o VFA (配列番号9) 及びsp o VFB (配列番号10) 、*Clostridium stercorarium*由来のsp o VFA (配列番号11) 及びsp o VFB (配列番号12) 、ならびに*Bacillus amyloliquefaciens*由来のsp o VFA (配列番号13) 及びsp o VFB (配列番号14) 等を挙げることができる。

10

【0045】

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

20

【0046】

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

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

(a) 配列番号3に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド;

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

30

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

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

40

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

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

50

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

(j) 配列番号 5 に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

(k) 配列番号 5 に示すヌクレオチド配列と少なくとも 80%、好ましくは 80% 以上、より好ましくは 90% 以上、より好ましくは 95% 以上、より好ましくは 96% 以上、より好ましくは 97% 以上、より好ましくは 98% 以上、より好ましくは 99% 以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、且つ (i) に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(l) 配列番号 5 に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドの相補鎖に対してストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、且つ (i) に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(m) 配列番号 6 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(n) 配列番号 6 に示すアミノ酸配列において 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、且つ (i) に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；及び、

(o) 配列番号 6 に示すアミノ酸配列と少なくとも 80%、好ましくは 80% 以上、より好ましくは 85%、より好ましくは 90% 以上、より好ましくは 95% 以上、より好ましくは 98% 以上、より好ましくは 99% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ (i) に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【0047】

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

【0048】

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

【0049】

本発明の枯草菌変異株において発現強化される枯草菌ジピコリン酸シンターゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子のなお別の好ましい例としては、枯草菌の *s p o V F A* 遺伝子、*Bacillus licheniformis* の *s p o V F A* 遺伝子、*Bacillus clausii* の *s p o V F A* 遺伝子、*Clostridium stercorarium* の *s p o V F A* 遺伝子、及び *Bacillus amyloliquefaciens* の *s p o V F A* 遺伝子からなる群より選択される少なくとも 1 つと、枯草菌の *s p o V F B* 遺伝子、*Bacillus licheniformis* の *s p o V F B* 遺伝子、*Bacillus clausii* の *s p o V F B* 遺伝子、*Clostridium stercorarium* の *s p o V F B* 遺伝子、及び *Bacillus amyloliquefaciens* の *s p o V F B* 遺伝子からなる群より選択される少なくとも 1 つとの組み合わせが

10

20

30

40

50

挙げられ、このうち、枯草菌 *s p o V F A* 遺伝子と枯草菌 *s p o V F B* 遺伝子との組み合
わせがより好ましい。

【0050】

上記ジピコリン酸シンターゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子の発現を強化する手段と
しては、例えば、野生型に比較し発現を強化できる制御領域（強制御領域）の制御下に当
該目的遺伝子を配置すること、及び制御領域、好ましくは強制御領域の制御下に配置され
た当該目的遺伝子を、宿主が本来有するジピコリン酸シンターゼ遺伝子に加えて、細胞内
のゲノム中若しくはプラスミド中に導入すること、などが挙げられる。

【0051】

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

10

【0052】

ジピコリン酸シンターゼ遺伝子発現強化のための詳細な手順の例を以下に記載する。ま
ず、制御領域及び上記ジピコリン酸シンターゼ遺伝子は、当該制御領域の制御下に当該遺
伝子が発現されるように配置され、さらに宿主ゲノムとの相同領域と結合されたDNA断
片として構築され得る。例えば、上流から、制御領域（例えば、後述する *s p o V G* 遺传
子制御領域）、ジピコリン酸シンターゼ・サブユニットA遺伝子、ジピコリン酸シンタ
ーゼ・サブユニットB遺伝子の順で配置した断片を作製し、さらにその断片に宿主ゲノムの
一部との相同領域を結合してDNA断片を調製する。次いで、このDNA断片を上述した
宿主に導入すれば、宿主ゲノム中に当該DNA断片が挿入されて、宿主を形質転換するこ
とができる。形質転換法としては、宿主となる枯草菌に応じて適切な、且つ一般的な方法
を採用することができる。得られた形質転換体は、形質転換前の宿主と比べてジピコリン
酸シンターゼ遺伝子を多数保有しているため、該遺伝子の発現量が増加する。

20

【0053】

本発明においてジピコリン酸シンターゼ遺伝子の発現強化に使用され得る制御領域の例
としては、バシラス属細菌由来の - アミラーゼ遺伝子の制御領域、プロテアーゼ遺伝子
の制御領域、リボソームタンパク質をコードする遺伝子（*r p l S* 遺伝子等）の制御領域
、*a p r E* 遺伝子の制御領域、*s p o V G* 遺伝子の制御領域、*Bacillus sp. K S M - S*
237株のセルラーゼ遺伝子の制御領域、*Staphylococcus aureus*由来のカナマイシン耐
性遺伝子の制御領域、クロラムフェニコール耐性遺伝子の制御領域等（いずれも、特開2
009-089708号公報を参照）が例示されるが、特に限定されない。目的遺伝子の
野生型の制御領域に比較して、目的遺伝子の発現を強化することができる制御領域が好
しい。

30

【0054】

（2-3. ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子発現強化）

40

本発明の枯草菌変異株は、上述したジピコリン酸シンターゼを強化した枯草菌変異株に
おいて、さらに枯草菌ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子の発
現を強化することにより得ることができる。

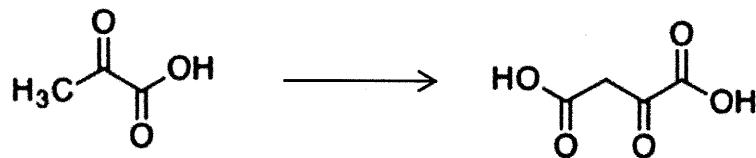
【0055】

本明細書において、ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子とは、下記式（2）の化学反応
を行なわせる活性を有するピルビン酸カルボキシラーゼをコードする遺伝子である。

【0056】

【化2】

式(2)



【0057】

10

枯草菌におけるピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子は *p y c A* 遺伝子にコードされている。枯草菌 *p y c A* 遺伝子のヌクレオチド配列及び当該 *p y c A* 遺伝子によりコードされるピルビン酸カルボキシラーゼのアミノ酸配列をそれぞれ配列番号 1 及び 2 に示す。

【0058】

20

枯草菌ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子に相当する遺伝子としては、枯草菌 *p y c A* 遺伝子と少なくとも 80%、好ましくは 80% 以上、より好ましくは 90% 以上、より好ましくは 95% 以上、より好ましくは 96% 以上、より好ましくは 97% 以上、より好ましくは 98% 以上、より好ましくは 99% 以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、且つ上述したピルビン酸からオキサロ酢酸への転換反応を触媒する活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチドが挙げられる。

【0059】

20

あるいは、枯草菌ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子に相当する遺伝子としては、枯草菌以外の微生物由来のピルビン酸カルボキシラーゼをコードする遺伝子が挙げられる。枯草菌以外の微生物に由来するピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子の例としては、*Bacillus licheniformis* 由来の *p y c A* (配列番号 15)、*Bacillus clausii* 由来の *p y c A* (配列番号 16)、*Clostridium acetobutylicum* 由来の *p y c A* (配列番号 17)、ならびに *Bacillus amyloliquefaciens* 由来の *p y c A* (配列番号 18) 等を挙げることができる。

【0060】

30

本発明の枯草菌変異株においては、上述した枯草菌ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子のいずれか 1 つ、又はいずれか 2 つ以上が発現強化されればよい。好ましくは上述した枯草菌ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子が発現強化されているとよい。

【0061】

40

本発明の枯草菌変異株において発現強化される枯草菌ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子の好ましい例としては、下記 (p) ~ (u) が挙げられる。

(p) 配列番号 1 に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

(q) 配列番号 1 に示すヌクレオチド配列と少なくとも 80%、好ましくは 80% 以上、より好ましくは 90% 以上、より好ましくは 95% 以上、より好ましくは 96% 以上、より好ましくは 97% 以上、より好ましくは 98% 以上、より好ましくは 99% 以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、ピルビン酸カルボキシラーゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(r) 配列番号 1 に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドの相補鎖に対してストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、且つピルビン酸カルボキシラーゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

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

(t) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列において 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、且つピルビン酸カルボキシラーゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；及び、

(u) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列と少なくとも 80%、好ましくは 80% 以上、よ

50

り好ましくは 85%、より好ましくは 90% 以上、より好ましくは 95% 以上、より好ましくは 98% 以上、より好ましくは 99% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つピルビン酸カルボキシラーゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【0062】

好ましくは、本発明の枯草菌変異株においては、上記 (p) ~ (u) からなる群より選択される少なくとも 1 つの遺伝子が発現強化される。より好ましくは、本発明の枯草菌変異株においては、上記 (p) の遺伝子が発現強化される。

【0063】

本発明の枯草菌変異株において発現強化される枯草菌ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子の別の好ましい例としては、上述した枯草菌の pycA 遺伝子、*Bacillus licheniformis* の pycA 遺伝子、*Bacillus clausii* の pycA 遺伝子、*Clostridium acetobutylicum* の pycA 遺伝子、及び *Bacillus amyloliquefaciens* の pycA 遺伝子からなる群より選択される少なくとも 1 つが挙げられ、このうち、枯草菌 pycA 遺伝子がより好ましい。

10

【0064】

上記ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子の発現を強化する手段としては、例えば、強発現制御領域の制御下に当該目的遺伝子を配置すること、及び制御領域、好ましくは強制御領域の制御下に配置された当該目的遺伝子を、宿主が本来有するピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子に加えて、細胞内のゲノム中若しくはプラスミド中に導入すること、などが挙げられる。

20

【0065】

例えば、本発明の枯草菌変異株は、上述したジピコリン酸シンターゼ遺伝子の発現が強化された枯草菌変異株を宿主として、そのゲノム上の目的ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子の制御領域配列を強発現制御領域に置換することによって作製することができる。あるいは、本発明の枯草菌変異株は、強発現制御領域の制御下に配置された目的ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子を当該宿主のゲノム中若しくはプラスミド中に導入することによって作製することができる。またあるいは、複数の目的ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子を当該宿主中に作動可能に存在させる改変により、該目的遺伝子の発現を強化することもできる。好ましくは、本発明の枯草菌変異株において、上述したピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子は、強発現制御領域の制御下に配置されている。

30

【0066】

ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子発現強化のための詳細な手順の例を以下に記載する。まず、制御領域及び上記ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子は、当該制御領域の制御下に当該遺伝子が発現されるように配置され、さらに宿主ゲノムとの相同領域と結合された DNA 断片として構築され得る。例えば、上流から、上述した制御領域（例えば、前述した rplS 遺伝子制御領域）、ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子の順で配置した断片を作製し、さらにその断片に宿主ゲノムの一部との相同領域を結合して DNA 断片を調製する。次いで、この DNA 断片を上述した宿主に導入すれば、宿主ゲノム中に当該 DNA 断片が挿入されて、宿主を形質転換することができる。形質転換法としては、宿主微生物に応じて適切な、且つ一般的な方法を採用することができる。得られた形質転換体は、形質転換前の宿主と比べてピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子を多数保有しているため、該遺伝子の発現量が増加する。

40

【0067】

本発明においてピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子の発現強化に使用され得る制御領域の例としては、上記でジピコリン酸シンターゼ遺伝子の発現強化に使用され得る制御領域として例示した制御領域が挙げられる。

【0068】

以上の手順で、ゲノムの大領域が欠失したゲノムを有し、且つ枯草菌ジピコリン酸シン

50

ターゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子の発現と、枯草菌ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子の発現とが強化された、本発明の枯草菌変異株を作製することができる。しかしながら、本発明の枯草菌変異株の製造方法においては、最終的に上述したゲノムの大領域の欠失、ジピコリン酸シンターゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子の発現強化、及びピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子の発現強化が達成されていればよく、当該ゲノムの欠失及び遺伝子の発現強化の改変を行う順序は特に限定されない。例えば、本発明の枯草菌変異株は、上述したゲノムの大領域が欠失した枯草菌変異株に対して、上述した手順でピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子を発現強化し、次いで上述した手順でジピコリン酸シンターゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子を発現強化することによって作製することもできる。

10

【0069】

(3. 本発明の枯草菌変異株を用いたDPA生産)

本発明の枯草菌変異株は高いDPA生産能を有している。本発明の枯草菌変異株は、ゲノムの大領域が欠失したゲノムを有し且つ枯草菌ジピコリン酸シンターゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子の発現が強化された枯草菌変異株と比べて、DPA生産能が向上している(下記実施例2参照)。本発明の枯草菌変異株を培養することによって当該菌体外に効率よくDPAが生産される。したがって、本発明の別の態様は、上述した本発明の枯草菌変異株を用いるDPA又はその塩の製造方法に関する。

20

【0070】

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

30

【0071】

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

40

【0072】

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

【0073】

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

50

【0074】

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

【0075】

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

【0076】

<1>枯草菌変異株であって、

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

枯草菌ジピコリン酸シンターゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子の発現と、枯草菌ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子の発現とが強化された、枯草菌変異株。

【0077】

<2>枯草菌変異株の製造方法であって、

prophage 6領域、prophage 1領域、prophage 4領域、PBS X領域、prophage 5領域、prophage 3領域、spb領域、pks領域、skin領域、pps領域、prophage 2領域、ydcL-ydeK-ydhU領域、ysisB-yitD領域、yunA-yurT領域、cgeE-ypmQ領域、yeek-yesX領域、pdp-rocR領域、ycxB-sipU領域、SKIN-Pr07領域、sbo-ywhH領域、yybP-yyyyaJ領域及びyncM-fosB領域からなる群より選択される1以上の領域が欠失したゲノムを有する枯草菌変異株において、枯草菌ジピコリン酸シンターゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子の発現と、枯草菌ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子の発現とを強化することを含む、方法。

【0078】

<3>枯草菌変異株の製造方法であって、

prophage 6領域、prophage 1領域、prophage 4領域、PBS X領域、prophage 5領域、prophage 3領域、spb領域、pks領域、skin領域、pps領域、prophage 2領域、ydcL-ydeK-ydhU領域、ysisB-yitD領域、yunA-yurT領域、cgeE-ypmQ領域、yeek-yesX領域、pdp-rocR領域、ycxB-sipU領域、SKIN-Pr07領域、sbo-ywhH領域、yybP-yyyyaJ領域及びyncM-fosB領域からなる群より選択される1以上の領域が欠失したゲノムを有し、且つ枯草菌ジピコリン酸シンターゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子の発現が強化された枯草菌変異株において、枯草菌ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子の発現を強化することを含む、方法。

【0079】

<4>上記<1>～<3>のいずれか1において、好ましくは、上記枯草菌変異株は、prophage 6領域、prophage 1領域、prophage 4領域、PBS X領域、prophage 5領域、prophage 3領域、spb領域、pks領域、skin領域、pps領域、prophage 2領域、ydcL-ydeK-ydhU領域、ysisB-yitD領域、yunA-yurT領域、cgeE-ypmQ領域、yeek-yesX領域、pdp-rocR領域、ycxB-sipU領域、SKIN-Pr07

10

20

30

40

50

領域、s b o - y w h H 領域、y y b P - y y a J 領域及びy n c M - f o s B 領域が欠失したゲノムを有する。

【0080】

<5>上記<1>～<4>のいずれか1において、好ましくは、上記各領域は、表1に記載の各オリゴヌクレオチドセットにより挿まれる領域である。

【0081】

<6>上記<1>～<5>のいずれか1において、好ましくは、上記枯草菌ジピコリン酸シンターゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子は、下記(i)及び(ii)に記載の遺伝子からなる群より選択される少なくとも1つである：

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

(a) 配列番号3に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

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

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

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

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

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

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

(j) 配列番号5に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

(k) 配列番号5に示すヌクレオチド配列と好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、より好ましくは96%以上、より好ましくは97%以上、より好ましくは98%以上、より好ましくは99%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、且つ(i)に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(l) 配列番号5に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドの相補鎖に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つ(i)に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(m) 配列番号6に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(n) 配列番号6に示すアミノ酸配列において1又は複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、且つ(i)に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

10

20

30

40

50

(o) 配列番号6に示すアミノ酸配列と好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、より好ましくは96%以上、より好ましくは97%以上、より好ましくは98%以上、より好ましくは99%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ(i)に記載の遺伝子がコードするタンパク質の存在下でジピコリン酸シンターゼ活性を発揮するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【0082】

<7> 上記<6>において、好ましくは、上記枯草菌ジピコリン酸シンターゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子は、以下の遺伝子である：

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

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

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

上記(i)(a)の遺伝子と上記(ii)(j)の遺伝子との組み合わせ。

【0083】

<8> 上記<1>～<7>のいずれか1において、上記枯草菌ジピコリン酸シンターゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子は：

好ましくは、枯草菌のsp o V F A遺伝子及びsp o V F B遺伝子、*Bacillus licheniformis*のsp o V F A遺伝子及びsp o V F B遺伝子、*Bacillus clausii*のsp o V F A遺伝子及びsp o V F B遺伝子、*Clostridium stercorarium*のsp o V F A遺伝子及びsp o V F B遺伝子、ならびに*Bacillus amyloliquefaciens*のsp o V F A遺伝子及びsp o V F B遺伝子からなる群より選択される少なくとも1つである；

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

【0084】

<9> 上記<8>において、上記枯草菌ジピコリン酸シンターゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子は：

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

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

【0085】

<10> 上記<1>～<9>のいずれか1において、好ましくは、上記枯草菌ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子は、下記(p)～(u)からなる群より選択される少なくとも1つである：

(p) 配列番号1に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

(q) 配列番号1に示すヌクレオチド配列と好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、より好ましくは96%以上、より好ましくは97%以上、より好ましくは98%以上、より好ましくは99%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、且つピルビン酸カルボキシラーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(r) 配列番号1に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドの相補鎖に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つピルビン酸カルボキシラーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

10

20

30

40

50

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

(t) 配列番号2に示すアミノ酸配列において1又は複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、且つピルビン酸カルボキシラーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(u) 配列番号2に示すアミノ酸配列と好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、より好ましくは96%以上、より好ましくは97%以上、より好ましくは98%以上、より好ましくは99%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つピルビン酸カルボキシラーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

10

【0086】

<11> 上記<10>において、好ましくは、上記枯草菌ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子は、以下の遺伝子である：

上記(p)～(u)からなる群より選択される少なくとも1つ；又は
上記(p)。

【0087】

<12> 上記<1>～<9>のいずれか1において、上記枯草菌ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子は：

好ましくは、枯草菌のp y c A遺伝子、*Bacillus licheniformis*のp y c A遺伝子、*Bacillus clausii*のp y c A遺伝子、*Clostridium acetobutylicum*のp y c A遺伝子、及び*Bacillus amyloliquefaciens*のp y c A遺伝子からなる群より選択される少なくとも1つである；

20

より好ましくは、枯草菌のp y c A遺伝子である。

【0088】

<13> 上記<1>～<12>のいずれか1において、好ましくは、上記ジピコリン酸シンターゼ遺伝子の発現の強化は、枯草菌ジピコリン酸シンターゼ・サブユニットA遺伝子又はこれに相当する遺伝子と、枯草菌ジピコリン酸シンターゼ・サブユニットB遺伝子又はこれに相当する遺伝子を、枯草菌s p o V G制御領域の制御下に配置することである。

【0089】

<14> 上記<1>～<13>のいずれか1において、好ましくは、上記ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子の発現強化は、上記枯草菌ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子又はこれに相当する遺伝子を枯草菌r p l S遺伝子の制御領域の制御下に配置することである。

30

【0090】

<15> 上記<1>及び<4>～<14>のいずれか1に記載の枯草菌変異株を用いるジピコリン酸又はその塩の製造方法。

【0091】

<16> 上記<2>～<14>のいずれか1に記載の方法で製造された枯草菌変異株を用いるジピコリン酸又はその塩の製造方法。

【0092】

<17> 上記枯草菌変異株を培養することと、培養物中からジピコリン酸を回収することとを含む、<15>又は<16>記載の方法。

40

【実施例】

【0093】

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

【0094】

(実施例1) 菌株の構築

(1-1) トリプトファン要求性解除株の作製

枯草菌野生株ゲノムの大領域が欠失した枯草菌変異株(MGB874株；特開2007-130013号公報)におけるトリプトファン要求性を解除した。枯草菌変異株MGB

50

874株の元株である枯草菌168株は、遺伝子型としてtrpC2を所持している。つまり168株はトリプトファン合成に関するインドール-3-グリセロールリン酸シンターゼをコードするtrpC遺伝子変異のためトリプトファン合成要求性である。また、枯草菌ATCC6051T株はトリプトファン非要求性であることが知られている (Albertini, A. M. & Galizzi, A. Microbiology, 1999, 145 (Pt 12) : 3319 - 3320)。枯草菌168株とATCC6051T株のtrpC遺伝子を比較したところ、328番目から330番目のヌクレオチドATTが枯草菌168株では存在しないことがわかった。そこで、ATCC6051T株ゲノムを鑄型とし、表2記載のtrpC_F1(配列番号19)及びtrpC_R1(配列番号20)のプライマーを用いてPCRを行い、PCR産物を構築した。このPCR産物を用いて枯草菌変異株MGB874株をコンピテント法で形質転換し、トリプトファン非添加のSMA寒天培地(0.2%硫酸アンモニウム、1.4%リン酸水素2カリウム、0.6%リン酸2水素カリウム、0.1%クエン酸3ナトリウム-2水和物、0.5%グルコース、0.035%硫酸マグネシウム7水和物、1.5%寒天)に生育したコロニーを形質転換体として分離した。こうしてトリプトファン非要求性MGB874T株を得た。

【0095】

(1-2)ジピコリン酸シンターゼ遺伝子が発現強化された枯草菌変異株(MGB874T_PspoVG-spoVFAB株)の構築

(1-1)で構築したMGB874T株を宿主として、ジピコリン酸シンターゼ遺伝子が発現強化された枯草菌変異株(MGB874T_PspoVG-spoVFAB株)の構築を行った。枯草菌168株から抽出したゲノムDNAを鑄型とし、表2記載のプライマー-spoVFA-F1(配列番号21)及びspoVFA-R1(配列番号22)を用いて、断片(A)をPCRにより増幅した。この断片(A)はspoVFA遺伝子(配列番号3)の開始コドンの上流に隣接する領域である。また、同ゲノムDNAを鑄型とし、表2記載のプライマー-spoVFA-F2(配列番号23)及びspoVFA-R2(配列番号24)を用いて、断片(B)をPCRにより増幅した。この断片(B)は、spoVFA遺伝子の開始コドンから下流の領域である。さらに、同ゲノムDNAを鑄型とし、表2記載のプライマー-spoVGpro-F(配列番号25)及びspoVGpro-R(配列番号26)を用いて、spoVG制御領域配列を含む断片(C)をPCRにより増幅した。さらに、プラスミドpDLT3(Morimoto, T. et al., Microbiology, 2002, Pt 11: 3539 - 3552)を鑄型とし、表2記載のプライマー-Cm-F(配列番号27)及びCm-R(配列番号28)を用いて、クロラムフェニコール耐性遺伝子とその制御領域を含む断片(D)をPCRにより増幅した。

【0096】

次に、得られた断片(A)、断片(D)、断片(C)及び断片(B)をこの順となる様に表2記載のプライマー-spoVFA-F1(配列番号21)及びspoVFA-R2(配列番号24)を用いてSOE-PCR法によって結合させ、約2.2kbのDNA断片を得た。得られたDNA断片を用いて、コンピテント法(J. Bacteriol., 1960, 81: 741 - 746)により枯草菌MGB874T株の形質転換を行い、クロラムフェニコールを含むLB寒天培地上に生育したコロニーを形質転換体として分離した(以下、分離した形質転換体をMGB874T_PspoVG-spoVFAB株と称する)。MGB874T_PspoVG-spoVFAB株は、ゲノム上に、生来のspoVFAB遺伝子と、導入したspoVG制御下のspoVFAB遺伝子の両方を有する、spoVFAB遺伝子の発現が強化された枯草菌変異株である。

【0097】

PCR及びそれに続くサンガーフラッシュ法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982, 74: 5463 - 5467)によるシーケンシングによって、構築したMGB874T_PspoVG-spoVFAB株のゲノム上のspoVFA制御領域とspoVFA遺伝子の間に、クロラムフェニコール耐性遺伝子及びspoVG遺伝子制御領域が挿入されていることを確認した。本実施例で得られた枯草菌変異株へのジピコリン酸シ

10

20

30

40

50

ンターゼ遺伝子の導入手順及び導入位置を図3に示す。

【0098】

(1-3) ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子が発現強化された枯草菌変異株 (MGB874T_PspoVG-spoVFA B_Prp1S-pycA株) の構築

恒常的発現制御領域として、リボソームタンパク質の一種であるrp1S遺伝子の制御領域を選出し、このrp1S遺伝子の下流とターミネーターとの間にピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子pycAを結合したコンストラクトを構築した。

枯草菌変異株MGB874T株のゲノムDNAを鑄型として、表2記載のプライマーrp1S-U F (配列番号29) 及びrp1S/SD-rp1V-R (配列番号30) を用いて、rp1S遺伝子上流領域である断片(A)をPCRにより増幅した。次いで、表2記載のプライマー-kan-pt4/rp1S-DF (配列番号31) 及びrp1S-DR (配列番号32) を用いて、rp1S遺伝子下流領域である断片(B)をPCRにより増幅した。さらに、表2記載のプライマー-SD-rp1V/pycA-F (配列番号33) と、プライマー-pycA/kan-pt4-R (配列番号34) とを用いて、枯草菌変異株MGB874T株のゲノムDNAを鑄型としてPCR増幅を行い、リボソームタンパク質をコードするrp1V遺伝子のSD配列(rp1V-SD)とpycA遺伝子のORFが結合した断片(C)を得た。次いで、カナマイシン遺伝子保有組換えプラスミドpAPNCK (BMB Microbiol., 2007, 7:69) を鑄型として、表2記載のプライマー-pycA/kan-pt4-F (配列番号35) 及びkan-pt4/rp1S-R (配列番号36) を用いて、カナマイシン耐性遺伝子断片(D)をPCRにより増幅した。

【0099】

次に、得られた断片(A)、断片(C)、断片(D)及び断片(B)をこの順となる様に、表2記載のプライマー-rp1S-U F (配列番号29) 及びrp1S-DR (配列番号32) を用いてSOE-PCR法によって結合させた。得られたDNA断片を用いて、枯草菌変異株MGB874T_PspoVG-spoVFA B株をコンピメント法で形質転換し、カナマイシン含有培地で選択してMGB874T_PspoVG-spoVFA B_Prp1S-pycA株を得た。MGB874T_PspoVG-spoVFA_B_Prp1S-pycA株は、ゲノム上に、生来のpycA遺伝子と、導入したPrp1S制御下のpycAの両方を有する、pycA遺伝子の発現が強化された枯草菌変異株である。

【0100】

サンガー法によるシークエンシングによって、構築したMGB874T_PspoVG-spoVFA B_Prp1S-pycA株に、目的の制御領域及び遺伝子が挿入されていることを確認した。本実施例で得られた枯草菌変異株へのピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子の導入手順及び導入位置を図4に示す。

【0101】

10

20

30

【表2】

プライマー	配列	配列番号
trpC_F1	TATTCAGTGACTCGATCAGCGTATG	19
trpC_R1	CTATTCAAACCACTCCCGAAAAGGT	20
spoVFA-F1	GAAGCTTAATGCTGAGCTTAG	21
spoVFA-R1	GCTCTCTGGTGGAGTCTATCCTATTTACTCTTGTGAGGAGGC	22
spoVFA-F2	GGCGAAAAGGAGGGAAAATAATGTTAACCGGATTGAAAATTGC	23
spoVFA-R2	TTCAGTGATACGTGCCAGATG	24
spoVGpro-F	CGGAAGGATACTACATCCTGGCGTTAGTCGAGATCGAAGTTA	25
spoVGpro-R	TATTTCCCTCCTTTCGCCCTATATAAAAGCATTAGTGTATC	26
Cm-F	GGATAGACTCCACCAGAACAGAGCATCATCGGCAATAGTTACCC	27
Cm-R	CCAGGATGTAGTATCCTCCCGCGCGTAGAGGATCTGGAGC	28
rplS-UF	CAAAGAAAGTGGATTCTGAATGGG	29
rplS/SD-rplV-R	TTAAAAGCCTCCTCTTATCGTCTGATCTTTAATACG	30
kan-pt4/rplS-DF	GAATTGTTTAGTACCTAGTGTATAACGAACGAAAAGAGC	31
rplS-DR	CCGGTTGATGAGCGTTGATTTCCG	32
SD-rplV/pycA-F	GAGAGGAGGCTTTAATTGTCTCAGCAATCGATACAAAAA	33
pycA/kan-pt4-R	ATTATTCCTCCTCTTTCTTATGCTTTCAATTCAA	34
pycA/kan-pt4-F	TTGAAATTGAAAAAGCATAAGAAAAGAGGAAGGAAATAAT	35
kan-pt4/rplS-R	GCTCTTCGTTGTTATCACTAGGTACTAAAACAATTC	36

【0102】

(実施例2) ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子が発現強化された枯草菌変異株のDPA生産性評価

実施例1で構築したMGB874T_PspoVG-spoVFA B株と、MGB874T_PspoVG-spoVFA B_PrplS-pycA株を、50mLの改変S7+MSG培地(10%グルコース、1.8%塩化アンモニウム、0.15%リン酸水素2カリウム、0.035%硫酸マグネシウム7水和物、0.005%硫酸マンガン5水和物、50mM MOPS(モノホリノプロパンスルホン酸)緩衝剤(pH7.0)、その他微量金属、200mM グルタミン酸ナトリウム1水和物、4.0%炭酸カルシウム、0.6%塩化アンモニウム)で37において8時間振盪培養を行い、得られた培養液を、改変S7+MSG培地(10%グルコース、0.6%塩化アンモニウム、0.15%リン酸水素2カリウム、0.035%硫酸マグネシウム7水和物、0.005%硫酸マンガン5水和物、50mM MOPS(モノホリノプロパンスルホン酸)緩衝剤(pH7.0)、その他微量金属、200mM グルタミン酸ナトリウム1水和物、4.0%炭酸カルシウム)50mLに接種し、37、200rpmで2日間、振盪培養を行った。

培養終了後、下記参考例に示す分析条件にてDPA生産量を測定し、MGB874T_PspoVG-spoVFA B株の生産量を100%とした場合の相対値を求めた。

【0103】

ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子を発現強化した枯草菌変異株MGB874T_PspoVG-spoVFA B_PrplS-pycA株は、ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子を発現強化前の株であるMGB874T_PspoVG-spoVFA B株と比較してDPA生産量が高かった(表3)。

【0104】

【表3】

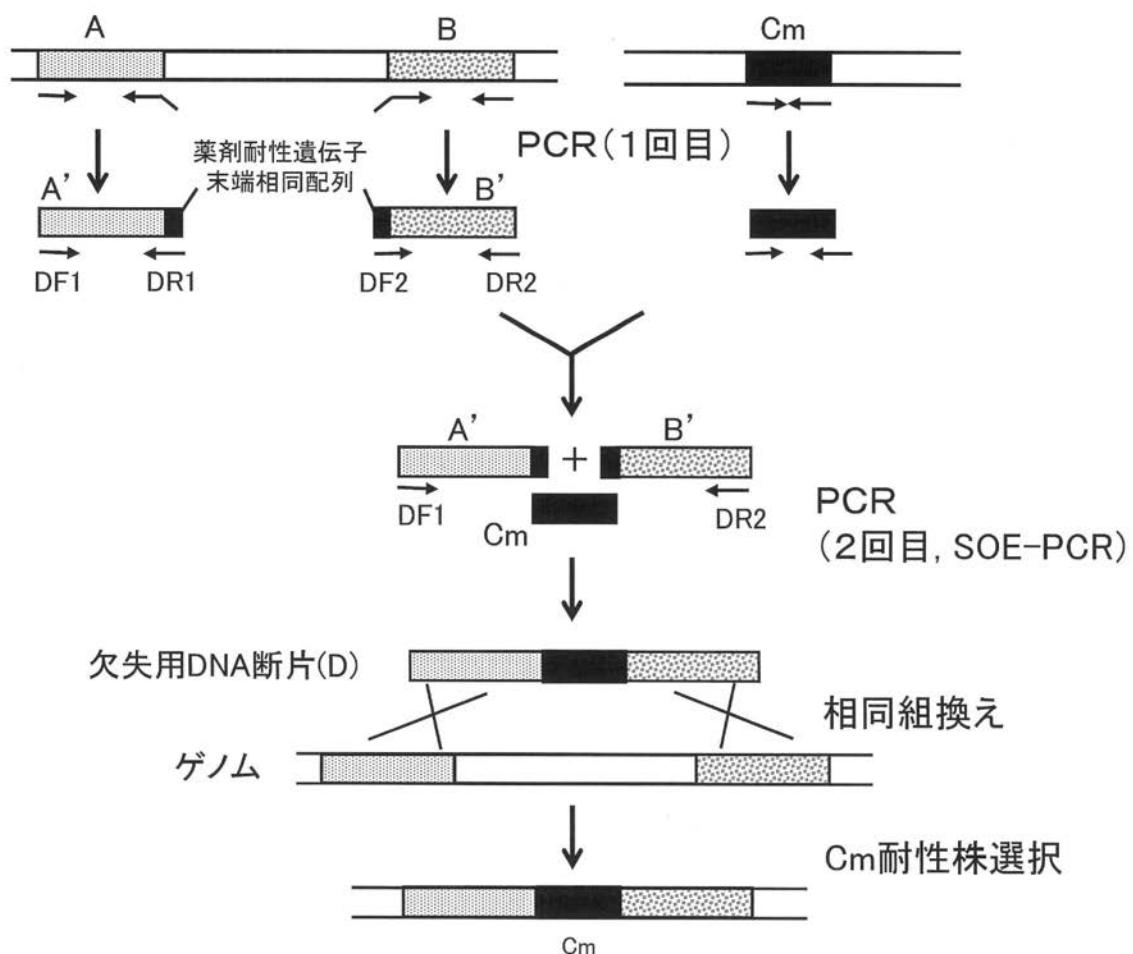
菌株名	DPA相対生産量(%) (培養2日目)
MGB874T_PspoVG-spoVFAB	100
MGB874T_PspoVG-spoVFAB_PrpIS-pycA	133.5

【0105】

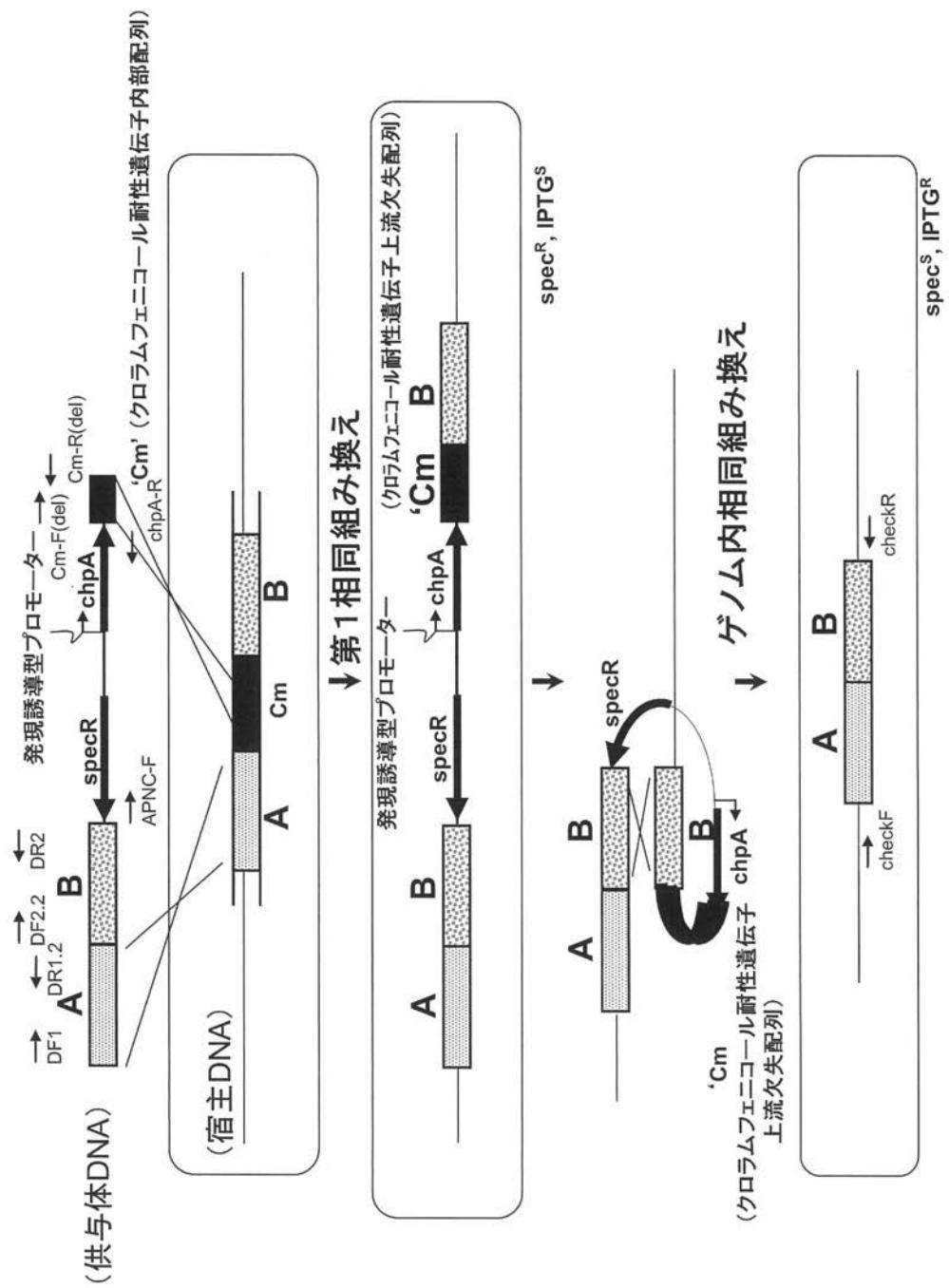
(参考例) DPAの定量及び分子量分析

培養終了後の培養液試料を、室温にて14,800 rpmで30分間の遠心分離(日立工機、himac CF15RX)に供し、得られた遠心分離後の試料上清中に含まれるDPAについて、HPLC法にて定量及び分子量分析を行った。HPLC装置は、送液ポンプ(島津、LC-9A)、オートサンプラー(日立計測機器、AS-2000)、カラムオーブン(島津、CTO-6A)、UV検出計(島津、SPD-10A)、脱ガス装置(GLサイエンス、DG660B)及びクロマトデータ解析装置(日立計測機器、D-2500)を接続したものを用いた。分析カラムは、High Performance Carbohydrate Column 60(4 μ m 4.6 \times 250 mm HPLC Column (Aminopropylmethylsilyl bonded amorphous silica)(Waters)を使用した。溶離液としては、20 mM EDTAを含む水を濃リン酸でpH 3.4に合わせた水溶液とアセトニトリル溶液とを1:1に混合した溶液を用いた。測定条件は、検出波長を270 nmとし、流速を1 mL/分とした。HPLC分析に供するサンプルは、不溶物を除くため、MULTI SCREEN MNHV45(MILLIPORE製、0.45 μ mデュラポア膜)にてフィルターろ過により前処理した。濃度検定は、2,6-Pyridinedicarboxylic acid:DPA, 99% (SIGMA-ALDRICH)を用いて作成した検量線に基づいて行った。

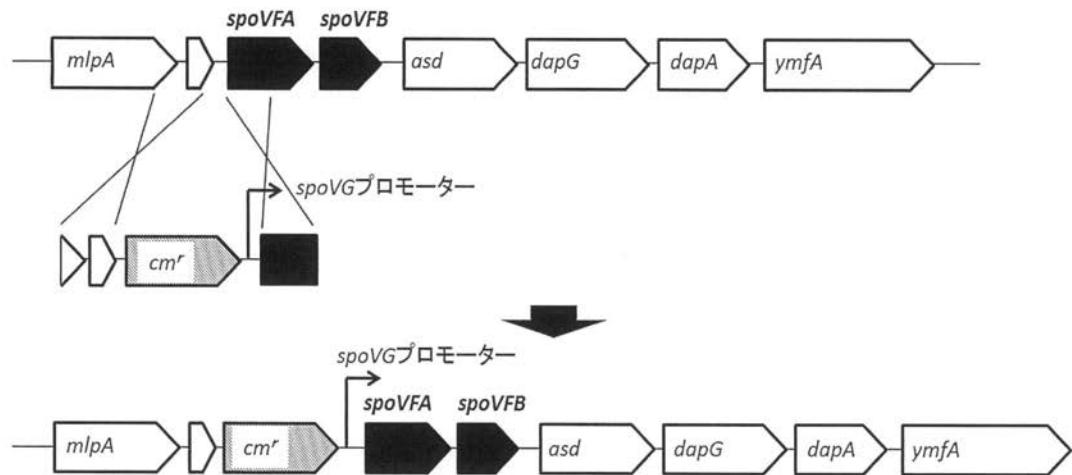
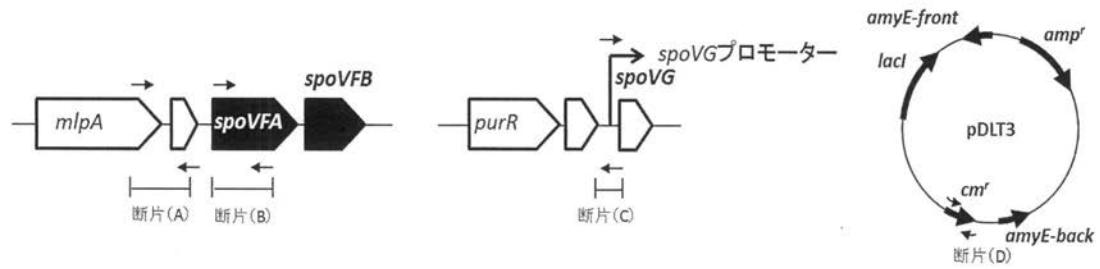
【図1】



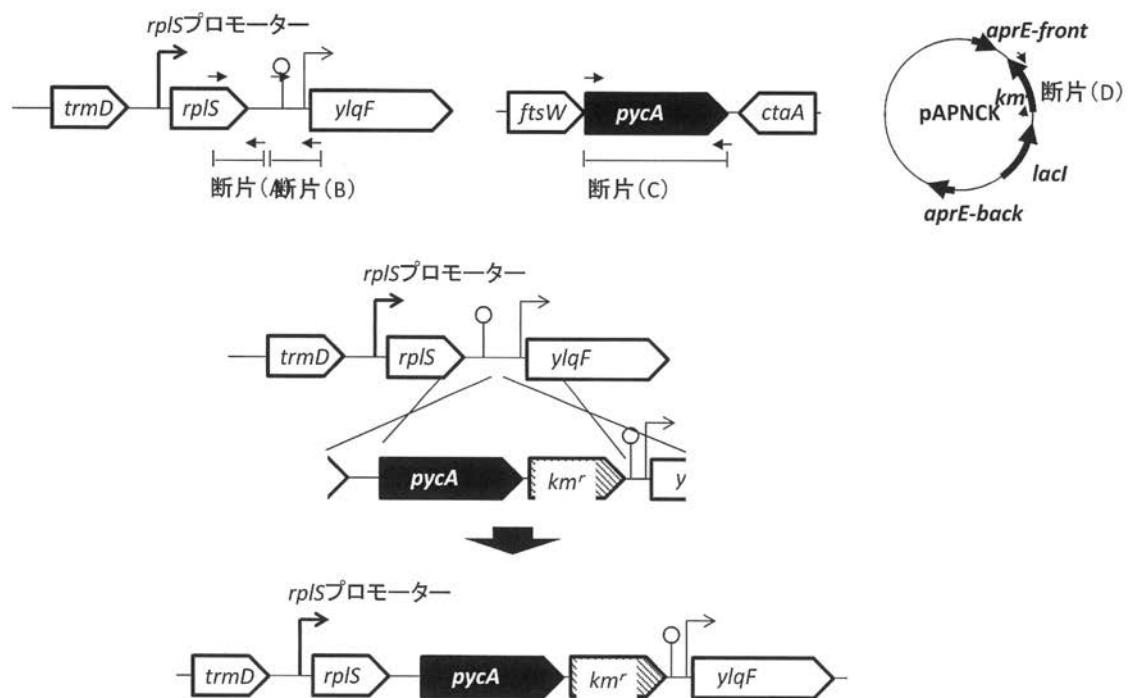
【 図 2 】



【図3】



【図4】



【配列表】

2015156844000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 森本 拓也
栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会社研究所内

(72)発明者 増田 健太
栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会社研究所内

(72)発明者 清水 浩
大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内

(72)発明者 戸谷 吉博
大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内

(72)発明者 平沢 敬
大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内

F ターム(参考) 4B024 AA03 BA07 BA80 CA01 DA05 EA04 GA11 GA25 HA08
4B064 AE49 CA02 CA19 CC24 DA01 DA20
4B065 AA19X AA19Y AB01 AC14 BA02 CA11 CA57 CA60