

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成29年3月2日(2017.3.2)

【公開番号】特開2015-156844(P2015-156844A)

【公開日】平成27年9月3日(2015.9.3)

【年通号数】公開・登録公報2015-055

【出願番号】特願2014-34291(P2014-34291)

【国際特許分類】

C 12 N 15/09 (2006.01)

C 12 N 1/21 (2006.01)

C 12 P 13/00 (2006.01)

【F I】

C 12 N 15/00 A

C 12 N 1/21

C 12 P 13/00

【手続補正書】

【提出日】平成29年1月6日(2017.1.6)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【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、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。

【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；

(b) 配列番号3に示すヌクレオチド配列と90%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、ここで該ストリンジェントな条件が、 $5 \times SSC$  中、85 以上でハイブリダイゼーションし、且つ $1 \times SSC$  中、73 以上で洗浄する条件である；

(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 90 % 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 90 % 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、ここで該ストリンジェントな条件が、 $5 \times SSC$  中、85 以上でハイブリダイゼーションし、且つ $1 \times SSC$  中、73 以上で洗浄する条件である；

(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 90 % 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；

(q) 配列番号 1 に示すヌクレオチド配列と 90 % 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、ここで該ストリンジェントな条件が、 $5 \times SSC$  中、85 以上でハイブリダイゼーションし、且つ $1 \times SSC$  中、73 以上で洗浄する条件である；

(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 90 % 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。

【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 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、pdpr - procR 領域、ycxB - sippU 領域、SKIN - Pro7 領域、sbo - ywhH 領域、yybP - yyaj 領域及びyncM - fosB 領域が欠失したゲノムを有する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。

【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；

(b) 配列番号 3 に示すヌクレオチド配列と 90 % 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、ここで該ストリンジェントな条件が、5 × SSC 中、85 % 以上でハイブリダイゼーションし、且つ 1 × SSC 中、73 % 以上で洗浄する条件である；

(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 90 % 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 90 % 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；

(1) 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、ここで該ストリンジェントな条件が、5×SSC中、85以上でハイブリダイゼーションし、且つ1×SSC中、73以上で洗浄する条件である；

(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90%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)  
(q)～(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90%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、ここで該ストリンジェントな条件が、5×SSC中、85以上でハイブリダイゼーションし、且つ1×SSC中、73以上で洗浄する条件である；

(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90%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。