

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3682435号
(P3682435)

(45) 発行日 平成17年8月10日(2005.8.10)

(24) 登録日 平成17年5月27日(2005.5.27)

(51) Int. Cl.⁷

F I

| | | |
|-----------------|---------------|---------|
| C 1 2 N 15/09 | C 1 2 N 15/00 | Z N A A |
| C 1 2 N 1/20 | C 1 2 N 1/20 | A |
| C 1 2 P 21/00 | C 1 2 P 21/00 | |
| /(C 1 2 N 1/20 | C 1 2 N 1/20 | A |
| C 1 2 R 1:125) | C 1 2 R 1:125 | |

請求項の数 3 (全 25 頁)

| | | | |
|-----------|-------------------------------|-----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願2002-30237 (P2002-30237) | (73) 特許権者 | 501145295 独立行政法人食品総合研究所 茨城県つくば市観音台2丁目1番地12 |
| (22) 出願日 | 平成14年2月7日(2002.2.7) | (73) 特許権者 | 302001446 木村 啓太郎 茨城県つくば市竹園三丁目302-906 |
| (65) 公開番号 | 特開2003-230384 (P2003-230384A) | (73) 特許権者 | 598035244 伊藤 義文 茨城県つくば市並木3丁目14-18 |
| (43) 公開日 | 平成15年8月19日(2003.8.19) | (74) 代理人 | 100074077 弁理士 久保田 藤郎 |
| 審査請求日 | 平成14年2月7日(2002.2.7) | (74) 代理人 | 100086221 弁理士 矢野 裕也 |
| 微生物の受託番号 | FERM P-18688 | (72) 発明者 | 木村 啓太郎 茨城県つくば市竹園3丁目302-906 |
| 微生物の受託番号 | FERM P-18695 | | 最終頁に続く |
| 微生物の受託番号 | FERM P-18687 | | |
| 微生物の受託番号 | FERM P-18694 | | |
| 微生物の受託番号 | FERM P-18696 | | |

(54) 【発明の名称】 γ -ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株及び該変異株を用いた γ -ポリグルタミン酸の製造法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

- グルタミルトランスぺプチダーゼ遺伝子にスペクチノマイシン耐性遺伝子が挿入され、かつ - ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ遺伝子にエリスロマイシン耐性遺伝子が挿入されたパチルス・ズブチリス N A F M 6 1 株 (F E R M P - 1 8 6 8 8)。

【請求項2】

化学的変異処理もしくは物理的変異処理により - グルタミルトランスぺプチダーゼ遺伝子及び - ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ遺伝子に変異を誘起したパチルス・ズブチリス N A F M 5 - 0 0 5 株 (F E R M P - 1 8 6 9 5)。

【請求項3】

請求項1または2に記載の - ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株を培地に培養し、培養物から - ポリグルタミン酸を採取することを特徴とする - ポリグルタミン酸の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、 - ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株及び該変異株を用いた - ポリグルタミン酸の製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】

従来、納豆菌を含むバチルス・ズブチリス (Bacillus subtilis)、バチルス・リケニホルミス (Bacillus licheniformis) 等の - ポリグルタミン酸生産微生物を用いる - ポリグルタミン酸の製造においては、生産された - ポリグルタミン酸が、当該微生物自身で作る - ポリグルタミン酸分解酵素によって分解されるため、収量や当該 - ポリグルタミン酸の分子量が一定しないという問題があった。

ところで、 - ポリグルタミン酸は納豆の糸引きの主成分であり、 - ポリグルタミン酸の含量と分子量などの化学構造が納豆の糸引きや粘りを大きく左右する。また、消費者の納豆の粘りに対する要望は様々であり、粘りの強い納豆のニーズも高いが、これまではこれらに十分対応する製品が得られていない。

一方、最近、 - ポリグルタミン酸に小腸からのカルシウムの吸収を促進する作用があることが発見 (Tanimoto H, Mori M, Motoki M, Torii K, Kadowaki M, Noguchi T, Natto mucilage containing poly-gamma-glutamic acid increases soluble calcium in the rat small intestine. Biosci Biotechnol Biochem. 2001 Mar;65(3):516-21.) され、 - ポリグルタミン酸をカルシウム吸収促進剤として利用することについても検討されている。

10

【 0 0 0 3 】

【 発明が解決しようとする課題 】

上記したように、 - ポリグルタミン酸生産微生物を用いる - ポリグルタミン酸の製造法は、生産された - ポリグルタミン酸が分解されるため、その収量が少ないこと、 - ポリグルタミン酸の分子量分布が広がること等が避けられず、収量が不安定であることが問題となっていた。

20

【 0 0 0 4 】

【 課題を解決するための手段 】

本発明の目的は、 - ポリグルタミン酸の収量が多く、しかも得られる - ポリグルタミン酸の分子量分布が一定の範囲となり、 - ポリグルタミン酸の安定な生産が可能な - ポリグルタミン酸生産微生物を提供すると共に、当該微生物を用いる - ポリグルタミン酸の製造法を提供することである。

【 0 0 0 5 】

本発明者らは、上記の目的を達成すべく、納豆菌の - ポリグルタミン酸合成と分解に関する酵素及び遺伝子の生化学的・分子遺伝学的な研究を行ってきた。

30

その過程で、 - グルタミルトランスぺプチダーゼ (以下、GGTと略記することもある。) を欠損する変異株が - ポリグルタミン酸をエキソ型に分解する活性を失うこと、さらに - ポリグルタミン酸をエンド型に分解する新規な酵素 (- ポリグルタミン酸ハイドロラーゼ) の遺伝子を発見し、当該遺伝子を pghA と命名した。

さらに、GGT 遺伝子及び / 又は pghA の転写・翻訳が正常に行われないうように変異を誘起させる方法について検討し、 - ポリグルタミン酸生産能を有する微生物の変異株を取得する方法を確立した。また、これらの変異株を培養して - ポリグルタミン酸を効率よく製造する方法も開発した。本発明は、これらの知見に基づいて完成されたものである。

【 0 0 0 6 】

40

すなわち、請求項 1 記載の本発明は、 - グルタミルトランスぺプチダーゼ遺伝子にスベクチノマイシン耐性遺伝子が挿入され、かつ - ポリグルタミン酸ハイドロラーゼ遺伝子にエリスロマイシン耐性遺伝子が挿入されたバチルス・ズブチリス NAF M61 株 (FERM P-18688) である。

請求項 2 記載の本発明は、化学的変異処理もしくは物理的変異処理により - グルタミルトランスぺプチダーゼ遺伝子及び - ポリグルタミン酸ハイドロラーゼ遺伝子に変異を誘起したバチルス・ズブチリス NAF M5-005 株 (FERM P-18695) である。

【 0 0 0 7 】

請求項 3 記載の本発明は、請求項 1 または 2 に記載の - ポリグルタミン酸分解酵素欠

50

損変異株を培地に培養し、培養物から - ポリグルタミン酸を採取することを特徴とする
- ポリグルタミン酸の製造法である。

【0008】

【発明の実施の形態】

本発明の請求項1および請求項2に係る - ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株は、
- ポリグルタミン酸生産微生物において、 - グルタミルトランスぺプチダーゼ遺伝子
及び - ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ遺伝子が共に変異している微生物である。当該
変異株は、 - ポリグルタミン酸をエキソ型に分解する - グルタミルトランスぺプチダ
ーゼ及び - ポリグルタミン酸をエンド型に分解する - ポリグルタミルヒドロラーゼ
の両者を欠損している。

10

当該変異株は、エキソ型及びエンド型の - ポリグルタミン酸分解酵素活性を持ってい
ないため、 - ポリグルタミン酸を大量に、かつ安定的に生産することができる。この変
異株は、培養物中に分子量が約200万ダルトン(2MDa)の - ポリグルタミン酸を
蓄積し、その蓄積量は、野性株の最大生産量の10倍に達する。

【0009】

本発明者らの知見によると、上記の二重変異株は、最小培地(8%グリセロール、0.
7%塩化アンモニウム、1.5%クエン酸ナトリウム、0.05%リン酸水素2カリウム
、0.05%硫酸マグネシウム、0.003%塩化第二鉄、0.015%塩化カルシウム
、0.01%塩化マンガン、0.5mg/Lビオチンを含む)で1リットル当たり10g
の - ポリグルタミン酸を蓄積し、栄養培地(GSP培地、グルコース1.5%、L-グ
ルタミン酸1.5%、フィトンペプトン1.5%)では、1リットル当たり30gの -
ポリグルタミン酸を蓄積する。なお、グリセロールやグルコース等の炭素源は、 - ポリ
グルタミン酸の生産を増強する効果があり、その効果は0.5%以上で顕著である。

20

【0010】

次に、 - ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株の取得方法について述べる。対象とさ
れる微生物は、 - ポリグルタミン酸生産能を有するもので、例えば納豆菌を含むバチル
ス・ズプチリスやバチルス・リケニホルミスなどを挙げることができる。これらの微生物
において、上記の酵素遺伝子の転写・翻訳が正常に行われないうちに、変異を誘起させる
ことによって、目的とする変異株を取得することができる。

納豆生産菌は、2種類のプラスミドを持っており(Nagai et al., Gen. Appl. Microbi
ol., 43:139-143, 1997)、内因性プラスミドの存在は形質転換体の解析の妨げとなる。そ
のため、本発明ではこれを除いたNAF M5株を野性型納豆菌として用いている。現在
納豆の製造に用いられている代表的な納豆菌は、宮城野菌、高橋菌、成瀬菌であるが、こ
れらは共通の菌株に由来することが分子遺伝学的手法で確認されている(Nagai T., Phan
Tran L.S., Inatsu Y., Itoh Y., J. Bacteriol., 182:2387-2392, 2000)。

30

【0011】

- ポリグルタミン酸分解酵素遺伝子に変異を誘起させる方法としては、当該酵素遺伝
子に他の遺伝子や適当な塩基数を有する塩基配列を挿入する方法、当該遺伝子のすべて又
は一部を欠損又は欠失させる方法及び化学的又は物理的変異処理によって塩基置換を起こ
させる方法が挙げられる。

40

例えば、他の遺伝子を挿入する場合には、 - グルタミルトランスぺプチダーゼ遺伝子
及び/又は - ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ遺伝子をクローニングした後、 - グル
タミルトランスぺプチダーゼ遺伝子のStu I 部位にスペクチノマイシン耐性遺伝子を、
- ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ遺伝子のBcl I 部位にエリスロマイシン耐性遺伝子を
挿入することによって、当該分解酵素遺伝子の機能を失った変異株を取得することができ
る。

さらに、挿入する遺伝子を適宜選択することによって、変異株を取得する際にマーカ
ーとして使用することもできる。また、当該遺伝子内又はプロモーター領域内にマーカ
ー遺伝子の挿入部位を適宜選択することによって、当該遺伝子の機能や発現能を失った変異株
を取得することができる。

50

- ポリグルタミン酸分解酵素遺伝子に変異を誘起させる方法としては、上記方法の他に、対象の微生物をエチルメタンサルフォネート（以下、EMSと略記することもある。）やニトロソグアニジンなどの変異誘起化学物質により化学的な変異処理や紫外線や放射線処理などの物理的な変異処理する方法もある。この化学的もしくは物理的な変異処理には、自然変異も含まれる。

【0012】

- グルタミルトランスぺプチダーゼ欠損変異株の取得方法の1例を以下に示す。まず、納豆菌バチルス・ズブチリスの培養上清から精製した - ポリグルタミルトランスぺプチダーゼのN末端アミノ酸配列をもとにデザインしたオリゴDNAプローブ（配列表の配列番号2）を用いて、ファージで構築したバチルス・ズブチリスのゲノムDNAライブラリー（Sambrook et al., Molecular cloning, 2nd edition, 1989 Cold Spring Harbor Laboratory Press）から、オリゴヌクレオチドECLラベリングディテクションキット（アマシャム バイオサイエンス社製）や5'末端を³²Pで標識する方法（Sambrook et al., Molecular cloning, 2nd edition, 1989 Cold Spring Harbor Laboratory Press）を用いたブランクハイブリダイゼーション法に従って - グルタミルトランスぺプチダーゼ遺伝子を選抜する。

10

この - グルタミルトランスぺプチダーゼ遺伝子の塩基配列をシーケンサー等の定法で解析したところ、配列表の配列番号3記載の塩基配列及びアミノ酸配列を有していた。

【0013】

次に、 - グルタミルトランスぺプチダーゼ遺伝子を含むSsp I-Bgl II断片をプラスミドpUC 118のHinc II-Bam HI部位にクローニングする。

20

クローニングした - グルタミルトランスぺプチダーゼ遺伝子のStu I部位に、プラスミドpDG 1726（A. M. Guerout-Fleury, K. Shazard, N. Frandsen and P. Stragier Gene 167:335-336, 1995）から単離したスペクチノマイシン耐性遺伝子を含むEco RV-Hinc II断片を挿入して、該遺伝子を破壊したプラスミドを構築する。

このプラスミドを用いて、定法によりバチルス・ズブチリスを形質転換させ（L. S. P. Tran, T. Nagai and Y. Itoh, Molecular Microbiol., 37(5), 1159-1171, 2000）、形質転換体を得る。

得られた形質転換体をLB培地にて30～40、好ましくは35～37で12～24時間、好ましくは18時間培養し（Sambrook et al., Molecular cloning, 2nd edition, 1989 Cold Spring Harbor Laboratory Press）、 - グルタミルトランスぺプチダーゼの酵素活性を指標として、 - グルタミルトランスぺプチダーゼ遺伝子欠損変異株を選抜する。

30

【0014】

- グルタミルトランスぺプチダーゼの酵素活性の測定は、発色基質である - グルタミルパラニトロアニリドの分解を指標として行うことができる。すなわち培養液50mLを遠心分離（6000rpm）して得た培養上清を試料として用い、以下の反応系を調製し、これを37で30分間保持した後、反応液の吸光度を波長410nmで測定することによって行う。

ここで、パラニトロアニリドの分子吸光係数を8800として、1分間に1μモルのパラニトロアニリドを遊離する活性を1Uとする。

40

【0015】

| | |
|-----------------------|---------|
| 培養上清 | 50 μL |
| 1 mM - グルタミルパラニトロアニリド | 250 μL |
| 1 M トリス塩酸緩衝液 | 50 μL |
| 滅菌脱イオン水 | 200 μL |
| （合計 | 550 μL） |

【0016】

上記の - グルタミルトランスぺプチダーゼの酵素活性を測定することにより、該酵素の著しく低い又は活性を持たない菌株を - グルタミルトランスぺプチダーゼ遺伝子欠損

50

変異株として選抜する。

【0017】

次に、　　-ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ遺伝子欠損変異株の取得方法の1例を以下に示す。まず、　　-グルタミル基を切断する様々な酵素の相同性を比較することによって得られるオリゴDNA-A（配列表の配列番号4）をプローブとして、上記のバチルス・ズブチリスのゲノムDNAライブラリーを検索する。その結果、オリゴDNA-Aと交雑する3つのクローンが得られた。

得られたクローンの塩基配列をシーケンサー等の定法により決定し、DDBJ等のデータベースを利用して既知の塩基配列との相同性を検索した結果、1つのクローンが完全長の新規な遺伝子を含むことが判明した。そこで、この新規な遺伝子をpghA、当該遺伝子によってコードされる酵素を　　-ポリグルタミン酸ヒドロラーゼと、それぞれ命名した。

10

なお、上記の塩基配列において1もしくは数個の塩基が置換、欠失、挿入、付加された、もしくは逆位を含む塩基配列であっても、同様の機能を有する限り　　-ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ遺伝子に包含される。

【0018】

上記によって単離した　　-ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ（pghA）遺伝子のBcl I部位にプラスミドpDG646（A. M. Guerout-Fleury, K. Shazard, N. Frandsen and P. Stragier Gene 167:335-336, 1995）から単離したエリスロマイシン耐性遺伝子を含むBam HI断片を導入して、当該遺伝子を破壊したプラスミドを構築する。

20

このプラスミドを用いて、定法によりバチルス・ズブチリスを形質転換し、形質転換体を得る。得られた形質転換体をLB培地にて30～37℃、好ましくは35～37℃で12～24時間、好ましくは18時間培養し、エリスロマイシン耐性と　　-ポリグルタミン酸の分解能を指標に、　　-ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ遺伝子欠損変異株を選抜する。

【0019】

　　-ポリグルタミン酸の分解能は、以下の方法で測定することができる。

変異処理したバチルス・ズブチリスを最小培地（8%グリセロール、0.7%塩化アンモニウム、1.5%クエン酸ナトリウム、0.05%リン酸水素2カリウム、0.05%硫酸マグネシウム、0.003%塩化第二鉄、0.015%塩化カルシウム、0.01%塩化マンガン、0.5mg/Lピオチン）に接種し、4～8日間、好ましくは7日間培養する。

30

培養終了後、培養物について遠心分離（6000rpm）を行い、培養上清を得る。得られた培養上清に、その1/5容の5M食塩水と2倍容のエタノールを加えて、生産された　　-ポリグルタミン酸を沈殿させる（Nagai et al., J. Gen. Appl. Microbiol. 43, 139-143, 1997）。

【0020】

得られた　　-ポリグルタミン酸を400μLのリン酸緩衝液に溶解し、10μLを1%アガロースゲル電気泳動（20V/cm、30分）に供して、分子量で分画する。分画後、メチレンブルー（pH9.5の30%エタノールに溶解）にて、アガロースゲル上に展開した　　-グルタミン酸を染色し、検出する。

40

　　-ポリグルタミン酸が分解されていれば、低分子化した　　-ポリグルタミン酸の移動度が大きくなることから容易に検出することができる。

電気泳動の結果から、　　-ポリグルタミン酸の分解能が著しく低下している菌株を、　　-ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ遺伝子欠損変異株として選抜する。

【0021】

また、　　-グルタミルトランスぺプチダーゼ遺伝子及び　　-ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ遺伝子が共に変異している　　-ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株の取得方法の1例を示すと、前述した遺伝子を破壊したプラスミド2種類を用いて、上記の方法にしたがって形質転換することによって取得することができる。　　-グルタミルトランスぺプ

50

ダーゼ遺伝子又は - ポリグルタミン酸ハイドロラーゼ遺伝子の欠損変異株を作成した後、当該変異株を化学的又は物理的変異処理を行って、選抜することによっても得ることができる。化学的又は物理的手段によって変異処理して取得した - グルタミルトランスペプチダーゼ遺伝子又は - ポリグルタミン酸ハイドロラーゼ遺伝子の欠損変異株を、さらに変異処理して両者の酵素活性を失った変異株を得ることもできる。なお、頻度は極めて低いが、人為的な変異処理を行わずに自然変異で生じた当該酵素欠損株を取得することも可能である。このようにして、選抜した微生物を N A F M 6 1 株、N A F M 5 - 0 0 5 株と命名した。これら菌株は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに、それぞれ受託番号 F E R M P - 1 8 6 8 8、F E R M P - 1 8 6 9 5 として寄託されている。

10

【0022】

化学的もしくは物理的に変異を誘起する処理を行い変異株を取得する方法について、E M S を使用する場合を例として説明すると、納豆菌などの - ポリグルタミン酸生産菌の培養物に E M S を加えて変異誘起処理を行う。その後、生理食塩水で希釈した培養液を L B 寒天培地などの固形培地に塗布して培養する。次いで、形成したコロニーを単離し、液体培地に接種して培養し、得られた培養物について - グルタミルパラニトロアニリド等の基質を用いて酵素活性を測定し、活性が消失もしくは著しく低下している菌株を選抜する。 - ポリグルタミン酸の分解活性は、アガロースゲル電気泳動で確かめることができる。このようにして、請求項 1 及び 2 に記載の変異株を取得することができる。

【0023】

本発明に係る変異株を用いて - ポリグルタミン酸を製造するには、当該微生物が良く生育し得る培地に培養し、生産された - ポリグルタミン酸を培養物から採取すればよい。この際に用いる培地としては、グリセロール、グルコース、フルクトース、マンニトール、キシロース、アラビノースなどの当該微生物が好む炭素源を含むものが好適である。培養は、30 ~ 45、好ましくは 35 ~ 40 で穏やかな振盪（1 分間あたり 120 ~ 150 回転）条件下で行う。また、グルタミン酸ナトリウムを適宜（0.5 ~ 1.5%）添加することによって、 - ポリグルタミン酸の生産を増大することができる。

20

【0024】

次に、 - ポリグルタミン酸の製造例を示す。 - ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株を、最小培地（8%グリセロール、0.7%塩化アンモニウム、1.5%クエン酸ナトリウム、0.05%リン酸水素 2 カリウム、0.05%硫酸マグネシウム、0.003%塩化第二鉄、0.015%塩化カルシウム、0.01%塩化マンガン、0.5 mg / L ビオチン）や栄養培地である G S P 培地（1.5%グルコース、1.5%L - グルタミン酸、1.5%フィトペプトン）に接種し、30 ~ 45、好ましくは 37 で、60 ~ 160 時間、好ましくは 140 時間培養し、 - ポリグルタミン酸の蓄積量が最大となった時点で培養を終了することによって、 - ポリグルタミン酸を大量に生産させることができる。

30

【0025】

本発明の - ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株は、 - ポリグルタミン酸を分解する酵素が活性を失っているため、生産された - ポリグルタミン酸は分解されない。そのため、 - ポリグルタミン酸の生産量が向上する上に、特定の分子量のものが得られる。また、当該変異株を用いて納豆を製造すると、糸引きの強い、粘りのある納豆が得られる。

40

培養物からの - ポリグルタミン酸の採取は、1 M となるように食塩を加えた後、エタノールで沈殿させる等の定法を適用すればよく、これによって、 - ポリグルタミン酸を大量に、かつ簡便に得ることができる。純度の高い - ポリグルタミン酸は、上記エタノール沈殿を繰り返すことや、高速液体クロマトグラフィー（以下、H P L C と略記することもある。）によるゲルろ過等の定法の精製法で得ることができる。

【0026】

本発明により得られる - ポリグルタミン酸は、その機能性に着目して様々な用途に用

50

いることができる。例えば、カルシウム吸収促進剤の他、微生物の培養に使用するバイオフィーム、食品や化粧品等のコーティング剤、水分吸収・保持剤、とろみを付けるための食品添加物等として利用することができる。

【0027】

【実施例】

以下に本発明を実施例等により説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

参考例1 (- グルタミルトランスぺプチダーゼ欠損変異株の取得方法)

納豆菌バチルス・ズブチリス(宮城野株)の培養上清から精製した - グルタミルトランスぺプチダーゼのN末端アミノ酸配列をもとにデザインしたオリゴDNAプローブ(配列表の配列番号2)を用いて、ファージで構築したバチルス・ズブチリスのゲノムDNAライブラリーから - グルタミルトランスぺプチダーゼ遺伝子を定法(Sambrook et al., Molecular cloning, 2nd edition, 1989 Cold Spring Harbor Laboratory Press)に従って選抜した。

10

この - グルタミルトランスぺプチダーゼ遺伝子の塩基配列をシーケンサー等の定法により解析したところ、配列表の配列番号3記載の塩基配列及びアミノ酸配列を有していた。

次に、 - グルタミルトランスぺプチダーゼ遺伝子を含むSsp I-Bgl II断片をプラスミドpUC 118 (Toyobo社製)のHinc II-Bam HI部位にクローニングした。

【0028】

20

クローニングした - グルタミルトランスぺプチダーゼ遺伝子のStu I 部位に、プラスミドpDG 1726 (A. M. Guerout-Fleury, K. Shazard, N. Frandsen and P. Stragier Gene 167:335-336, 1995) から単離したスペクチノマイシン耐性遺伝子を含むEco RV-Hinc II断片を挿入して、当該遺伝子を破壊したプラスミドを構築した。

このプラスミドを用いて、バチルス・ズブチリスを形質転換させ(L. S. P. Tran, T. Nagai and Y. Itoh Molecular Microbiol. 37(5), 1159-1171, 2000)、形質転換体を得た。

得られた形質転換体をLB培地にて37℃で18時間培養し(Sambrook et al., Molecular cloning, 2nd edition, 1989 Cold Spring Harbor Laboratory Press)、 - グルタミルトランスぺプチダーゼの酵素活性を指標として、 - グルタミルトランスぺプチダーゼ遺伝子欠損変異株を選抜した。

30

本菌をバチルス・ズブチリスNAF M13株(FERM P-18687)と命名した。

【0029】

- ポリグルタミルトランスぺプチダーゼの酵素活性の測定は、発色基質である - グルタミルパラニトロアニリドの分解を指標として行った。すなわち、上記の培養液50mLを遠心分離(6000rpm)して得た培養上清を試料として用いて以下の反応系を調製し、これを37℃で30分間保持した後の吸光度を波長410nmで測定することによって行った。結果を表1に示す。

なお、パラニトロアニリドの分子吸光係数を8800として、1分間に1μモルのパラニトロアニリドを遊離する活性を1Uとする。活性の算出には、検量線としてパラニトロアニリドを用い、野生型納豆菌についても、同様に - グルタミルトランスぺプチダーゼ活性を測定した。

40

【0030】

| | |
|-----------------------|---------|
| 培養上清 | 50 μL |
| 1 mM - グルタミルパラニトロアニリド | 250 μL |
| 1 M トリス塩酸緩衝液 | 50 μL |
| 滅菌脱イオン水 | 200 μL |
| (合計 | 550 μL) |

【0031】

50

参考例 2 (- グルタミルトランスぺプチダーゼ欠損変異株の取得方法)

納豆菌バチルス・ズブチリスを LB 培地 2 mL (Sambrook et al., Molecular cloning, 2nd edition, 1989 Cold Spring Harbor Laboratory Press) にて 37 °C で 5 時間培養した後、EMS (SIGMA 社製) を 2 % (v / v) となるように加え、さらに 15 分間振盪培養し、変異誘起処理を行った。

変異誘起処理した後、生理食塩水で 1 万分の 1 となるように希釈した培養液を、LB 寒天培地 (Sambrook et al., Molecular cloning, 2nd edition, 1989 Cold Spring Harbor Laboratory Press) に塗布し、これを 37 °C で一夜培養した。

培養終了後、LB 寒天培地上に形成したコロニーを単離し、2 mL の LB 培地に接種し、これを 37 °C で 14 時間培養した。培養物から遠心分離 (6000 rpm) により菌体を除去することによって得た培養上清について、参考例 1 と同様に、 - グルタミルパラニトロアニリドを基質に用いて、 - グルタミルトランスぺプチダーゼ活性を測定した。結果を表 1 に示す。酵素活性が消失もしくは著しく低下している菌株を選抜し、この変異株をバチルス・ズブチリス N A F M 5 - 001 株 (F E R M P - 18694) と命名した。

【 0032 】

【 表 1 】

表 1

| 菌 株 | γ -ホリグルタミルトランスぺプチダーゼ活性 |
|-------------------------|-------------------------------|
| 野生型納豆菌 | 3.5 mU / mL |
| <u>参考例 1</u> の分解酵素欠損変異株 | < 0.01 mU / mL |
| <u>参考例 2</u> の分解酵素欠損変異株 | < 0.01 mU / mL |

【 0033 】

表 1 から明らかなように、参考例 1、2 によって得られた - グルタミルトランスぺプチダーゼ遺伝子に変異を導入して得た変異株は、 - グルタミルトランスぺプチダーゼ活性が検出限界以下である。このことから、いずれの変異誘起方法においても、 - グルタミルトランスぺプチダーゼ遺伝子に変異を誘起できることが示された。

【 0034 】

参考例 3 (- ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ遺伝子の調製)

- ポリグルタミル基を切断する様々な酵素の相同性の比較を行い、配列表の配列番号 4 のオリゴ DNA を含む数種類のオリゴ DNA プライマーを作成し、参考例 1 のバチルス・ズブチリスゲノム DNA ライブラリーを検索した。

その結果、配列表の配列番号 4 のオリゴ DNA - A プローブと交雑する 3 つのクローンが得られた。

得られたクローンについて、ダイターミネータサイクルシーケンスキット (A B I 社製) を用いて塩基配列 (配列表の配列番号 1) を決定し、これをもとに D D B J のデータベースにて塩基配列の相同性を比較した結果、このものは新規な機能を有する遺伝子であることが判明した。そこで、この遺伝子を p g h A 遺伝子と名づけ、当該遺伝子によってコードされる酵素を - ポリグルタミン酸ヒドロラーゼと命名した。

【 0035 】

参考例 4 (- ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ欠損変異株の取得方法)

参考例 3 で調製した - ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ (p g h A) 遺伝子の Bcl I 部位にプラスミド pDG 646 (A. M. Guerout-Fleury, K. Shazard, N. Frandsen and P. Stragier Gene 167:335-336, 1995) から単離したエリスロマイシン耐性遺伝子を含む Bam HI 断片を導入して、当該遺伝子を破壊したプラスミドを構築した。

このプラスミドで納豆菌バチルス・ズブチリスを定法により形質転換し、エリスロマイシン耐性と - ポリグルタミン酸分解能を指標に、 - ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ欠損変異株を取得した。

10

20

30

40

50

すなわち、形質転換したバチルス・ズブチリスをエリスロマイシン $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ を添加した LB 培地にて 37°C で 18 時間培養した。その結果、培地上にコロニーを形成した菌株をエリスロマイシン耐性菌株として選抜した。

【0036】

続いて、エリスロマイシン耐性菌株について、 γ -ポリグルタミン酸の分解能を以下の方法で測定した。まず、当該変異納豆菌バチルス・ズブチリスを最小培地（8%グリセロール、0.7%塩化アンモニウム、1.5%クエン酸ナトリウム、0.05%リン酸水素2カリウム、0.05%硫酸マグネシウム、0.003%塩化第二鉄、0.015%塩化カルシウム、0.01%塩化マンガン、0.5mg/Lピオチン）2mLに接種し、7日間培養した。

10

培養後、遠心分離（6000rpm）を行い、培養上清を得た。こうして得た培養上清に、培養上清の1/5容の5M食塩水と2倍容のエタノールを加え、生産された γ -ポリグルタミン酸を沈殿させた(Nagai et al., J. Gne. Appl. Microbiol. 43, 139-143, 1997)。

【0037】

得られた γ -ポリグルタミン酸を400 μL のリン酸緩衝液に溶解し、10 μL を1%アガロースゲル電気泳動（20V/cm、30分）に供する。泳動動、メチレンブルー（pH9.5の30%エタノールに溶解）にて、アガロースゲル上に展開した γ -グルタミン酸を染色し、検出した。

電気泳動の結果から、 γ -ポリグルタミン酸の分解能が著しく低下している菌株を、 γ -ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ遺伝子欠損変異株として選抜し、これをバチルス・ズブチリスNAF M60株（FERM P-18696）と命名した。

20

また、参考例2と同様にEMSを用いて変異誘起処理を行って得た変異株についても、同様の結果が得られた。

【0038】

実施例1（ γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ及び γ -ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ遺伝子欠損変異株の取得方法）

γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ遺伝子及び γ -ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ遺伝子の両者を欠損している変異株を、参考例1、3で調製した遺伝子を破壊したプラスミド2種類を用いて、納豆菌バチルス・ズブチリスを定法に従って形質転換することによって得た。また、参考例2と同様に、EMSによって変異処理して得た欠損変異株についても、同様に以下の操作を行った。

30

得られた形質転換体について、参考例1と同様に発色基質パラニトロアニリド分解活性を指標として γ -グルタミルトランスぺプチダーゼを、また参考例4と同様にアガロースゲル電気泳動による γ -ポリグルタミン酸の分解能を指標として γ -ポリグルタミン酸ヒドロラーゼの有無を判定することによって目的とする変異株を選抜した。このようにして、二重変異株NAF M61株（FERM P-18688）及びNAF M5-005株（FERM P-18695）を得た。結果を表2に示す。図1は、アガロースゲル電気泳動を行った電気泳動像を示したものである。

【0039】

40

【表2】

表2

| 菌 株 | γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ活性 |
|-----------------|-----------------------------|
| 野生型納豆菌 | 3.5 mU/mL |
| 参考例1の欠損変異株 | < 0.01 mU/mL |
| 参考例2のEMS処理欠損変異株 | < 0.01 mU/mL |
| 実施例1の欠損変異株 | < 0.01 mU/mL |
| 実施例1のEMS処理欠損変異株 | < 0.01 mU/mL |

50

【 0 0 4 0 】

この結果、実施例 1 で得られた欠損変異株は、参考例 1、2 で得られた欠損変異株と同様に、 α -グルタミルトランスぺプチダーゼ活性を測定して得られた結果から、酵素活性が検出限界以下であることが明らかとなった。また、アガロースゲル電気泳動の結果から、 α -ポリグルタミン酸ヒドロラーゼの活性が失われていることが明らかとなった。これらのことから、本発明の方法によって二重変異株が取得できることが分かった。

【 0 0 4 1 】

実施例 2 (α -ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株を用いた α -ポリグルタミン酸の大量生産)

実施例 1 で得た α -グルタミルトランスぺプチダーゼ遺伝子及び α -ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ遺伝子欠損変異株を、前記最小培地あるいは G S P 培地 1 0 0 m L に接種し、37℃ で 2 ~ 7 日間培養した。なお、比較のため野生型納豆菌及び参考例 1 で得た α -グルタミルトランスぺプチダーゼ遺伝子欠損変異株についても、同様に試験を行った。

培養終了後、菌体を遠心分離 (6 0 0 0 r p m) によって除去し、培養上清を得た。得られた培養上清に、2 倍容のエタノールを加えて α -ポリグルタミン酸を沈殿させた後、遠心分離 (1 2 0 0 0 r p m) によって回収した。このエタノールによる沈殿操作を 2 回繰り返したのち、定法により減圧乾燥を行って α -ポリグルタミン酸を得た。

【 0 0 4 2 】

上記の α -ポリグルタミン酸について、抗 α -ポリグルタミン酸 (P G A) 血清を用いた 2 次元免疫電気泳動法 (Uchida et al., Mol. Microbiol., 9:487-496, 1993) を行い、分子量分布の分析を行った。2 次元免疫電気泳動法において、1 次元目は 1 . 2 % アガロースゲル、2 次元目は 1 0 % (v / v) の抗 α -P G A 血清 (Uchida et al., Mol. Microbiol., 9:487-496, 1993) を含む 1 . 2 % アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。

電気泳動終了後、アガロースゲルを生理食塩水で洗浄した後、アミドブラックで染色し、泳動像を分析して培養期間中の α -ポリグルタミン酸の分子量の変化を検討した。図 2 は、2 次元免疫電気泳動終了後の α -ポリグルタミン酸の泳動像である。

また、精製した α -ポリグルタミン酸を試料として H P L C に供し、生産された α -ポリグルタミン酸の濃度と分子量を求めた (Nagai et al., J. Gen. Appl. Microbiol. 43, 139-143, 1997) 。 H P L C で用いたカラムは Asahipack GAF-7M (昭和電工社製) であり、溶媒 (5 0 m M リン酸ナトリウム、1 0 0 m M 硫酸ナトリウム、p H 6 . 8) 、流速 0 . 6 m l / 分の条件で実施した。

【 0 0 4 3 】

野生型納豆菌を用いて生産された α -ポリグルタミン酸は、当該納豆菌によって産生される α -ポリグルタミン酸分解酵素 (α -グルタミルトランスぺプチダーゼ及び α -ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ) により分解されるため、得られる α -ポリグルタミン酸量は極めて少ないだけでなく、最終的にはグルタミン酸にまで完全に分解されてしまうことが明らかとなった。

また、参考例 1 で得た α -グルタミルトランスぺプチダーゼ欠損変異株 N A F M 1 3 (F E R M P - 1 8 6 8 7) によって生産される α -ポリグルタミン酸は、 α -ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ活性の影響を受けて分解し、平均分子量が 1 0 万ダルトン (0 . 1 M D a) の α -ポリグルタミン酸となることが明らかとなった。

【 0 0 4 4 】

実施例 1 で得た α -グルタミルトランスぺプチダーゼ及び α -ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ遺伝子の欠損変異株 N A F M 6 1 株 (F E R M P - 1 8 6 8 8) 及び N A F M 5 - 0 0 5 株 (F E R M P - 1 8 6 9 5) によって生産される α -ポリグルタミン酸は、 α -グルタミルトランスぺプチダーゼ及び α -ポリグルタミン酸ヒドロラーゼの両酵素活性が殆ど残存していないため、平均分子量が 2 0 0 万ダルトン (2 M D a) の α -ポリグルタミン酸が蓄積していることが明らかとなった。

これに対して、 α -グルタミン酸ヒドロラーゼ遺伝子欠損変異株によって生産される α -ポリグルタミン酸は、 α -グルタミルトランスぺプチダーゼの酵素活性が残存してい

るため、分子量が500万ダルトン(5MDa)から5000ダルトン(5kDa)という広い範囲に分布していることが分かった。

【0045】

図2から明らかなように、野生型納豆菌では、培養期間を通して - ポリグルタミン酸の蓄積量は少なく、培養期間が長くなるほど、 - ポリグルタミン酸が分解されて分子量が小さくなる傾向であった。

また、 - グルタミルトランスぺプチダーゼ遺伝子欠損変異株では、培養2日目には、500万ダルトン(5MDa)の - ポリグルタミン酸が生産されているが、培養7日目になると、10万ダルトン(0.1MDa)のものが平均となり、かつ生産量も野生型納豆菌に比べ、大量に蓄積することが判明した。

さらに、 - グルタミルトランスぺプチダーゼ遺伝子及び - ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ遺伝子欠損変異株では、培養7日目には分子量が500万ダルトン(5MDa)の - ポリグルタミン酸が存在し、平均分子量が200万ダルトン(2MDa)を示している。このことから、野生型納豆菌や - グルタミルトランスぺプチダーゼ遺伝子欠損変異株と比べて、分子量の大きい - ポリグルタミン酸が大量に得られることが明らかとなった。

【0046】

参考例5(- ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株の変異遺伝子の同定法)

参考例1~4で得られた - ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株が、 - グルタミルトランスぺプチダーゼ遺伝子、 - ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ遺伝子の変異に起因することを、当該遺伝子を使った相補性試験で確認した。

すなわち、参考例1で調製したバチルス・ズブチリスの - グルタミルトランスぺプチダーゼ遺伝子(Ssp I-Bgl II断片)及び参考例3で調製した - ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ遺伝子(Hind III断片)を、pDG 1662等のインテグレーション用プラスミドベクターに常法によりクローニングし、プラスミド(図3)を得た。

【0047】

このプラスミドを用いて、 - ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株のアミラーゼ遺伝子(amyE)座位に定法(Anne-Marie et al., Gene, 180:57-61, 1996)を用いて組み込み、形質転換したバチルス・ズブチリスを得た。

こうして得た形質転換体のバチルス・ズブチリスの - ポリグルタミン酸の分解能を評価することによって、 - ポリグルタミン酸分解酵素の欠損が、 - グルタミルトランスぺプチダーゼ遺伝子あるいは - ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ遺伝子の変異を原因とすることを判定する。

【0048】

- グルタミルトランスぺプチダーゼ遺伝子欠損変異株の相補性試験は、参考例1と同様に培養して得た培養上清について、 - グルタミルパラニトロアニリドの分解を指標として、 - グルタミルトランスぺプチダーゼの活性を測定することにより行った。このとき、形質転換株の当該酵素活性が、野生型納豆菌と同等のレベルに回復している場合、当該変異は - グルタミルトランスぺプチダーゼ遺伝子の変異であることが証明できる。

【0049】

次に、 - ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ遺伝子欠損変異の相補性試験は、参考例3と同様に、エタノール沈殿させた - ポリグルタミン酸についてアガロースゲル電気泳動法により行った。アガロースゲル電気泳動を行って得た泳動像において、野生型納豆菌と同等に - ポリグルタミン酸が分解されていれば、当該変異が - ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ遺伝子に由来することが証明できる。

【0050】

また、相補性試験は、pHB 201(Bacillus genetic stock center Ohio, U.S.A)等の大腸菌-納豆菌シャトルベクターを用いても行った。プラスミドpHB 201のマルチクローニングサイトに、納豆菌の - グルタミルトランスぺプチダーゼ遺伝子(Ssp I-Bgl II断片)及び - ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ遺伝子(Hind III断片)を定法によりクローニ

10

20

30

40

50

ングし、これを用いて大腸菌DH5株を形質転換し、該大腸菌をLB培地で18時間培養することによって該プラスミドを増殖させた。

【0051】

増殖させた該プラスミドを用いて、
- ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株を形質転換した。すなわち、この操作により、
- ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株に
- グルタミルトランスペプチダーゼ遺伝子及び
- ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ遺伝子を再度導入することとなる。

これによって
- ポリグルタミン酸の分解活性が野生型納豆菌の分解レベルと同等であれば、
- ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株の変異は
- グルタミルトランスペプチダーゼ遺伝子あるいは
- ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ遺伝子の変異であると特定できる。

10

【0052】

以上の相補性試験の結果、いずれの場合も
- ポリグルタミン酸の分解能は野生型納豆菌と同等のレベルに回復していたことから、本発明の
- ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株における
- ポリグルタミン酸の生産量の増大は、
- グルタミルトランスペプチダーゼ遺伝子あるいは
- ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ遺伝子の変異に起因するものであることが判明した。

【0053】

【発明の効果】

本発明に係る
- ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株は、大量の
- ポリグルタミン酸を安定的に生産することができる。しかも、糸引きが強く、粘りのあるため、納豆の製造に利用することができる。

20

本発明で開発された変異株は、
- ポリグルタミン酸分解酵素活性を失っているため、当該微生物によって生産された
- ポリグルタミン酸は分解されない。従って、本発明の変異株を用いることによって、収量の安定した
- ポリグルタミン酸の生産が可能となる。さらに、
- ポリグルタミン酸が分解されないために、大幅な収量の増大も達成できる。また、平均分子量が2MDaの
- ポリグルタミン酸が得られるので、その性質に応じた用途に使用することができる。

【0054】

- ポリグルタミン酸は、バイオフィルム、食品や化粧品等に使用するコーティング剤、水分吸収・保持剤、とろみを付けるための食品添加剤等の既知の用途の他に、カルシウム吸収促進作用等の機能性が着目されており、本発明は、かかる用途に関係する商品の開発に大きな効果をもたらすことが期待される。

30

【0055】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> 独立行政法人 食品総合研究所

<120> γ -ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株及び該変異株を用いた γ -ポリグルタミン酸の製造法

<130> P131243K

<160> 4

<210> 1

<211> 3477

<212> DNA

<213> *Bacillus subtilis*

<400> 1

```

ccatttatat ttattgaccg ctteatggcg gatcagcggg atcacggaag gtccgccgcc    60
gaaccctaata atgccgggtgc gaaccattgc ggccgtcata tcccgataag gatgggtttt    120
cattcgtttc tctcctttac agcttcattc ccatacggct tttgtatcgt ttgatcagca    180
tctggcaatc aacactgacg acgcccgcga atggatacag ccgttttigt aaaaattcct    240
ccatttcttg atcgttggca aagatcccat gcatatgcag ctgctcggg ccigtcatgt    300
gataaaggct ggtgaccgca ggcctttcct caagcttaag agcgacctct tctaaaaatt    360
gcggttctac ctgcacattg aaaaacacgg aaacatgaat gccgatitaa gcgggattga    420
tgacagcggg gaatttttca ataacaccgg ctcaattaa ttggttgata cgggcctgca    480
cggcgacccg tgacaaatcg actcttttgc caagatccgt ataagaaatt ctgccittct    540
catgcaaaat cgtgagaatt tttttatcag tctcatcaag tacaaggttg gggatttgat    600
attcatgact caattgctcc acctgccttc gtagcctttt agcaatcatt ttatcacaaa    660
agttacgtat cgaataataa atttttcatt tgttttcgaa atgaacgaaa aaatatcttg    720
ttatttgcga aaagttagaaa gttcgtcagt tttctgccc gatcagtaga tgtgaaaaat    780
caggctccct atactgaaga aaatttctta aaaaagggga ctgtg atg aac aga    835

```

Met Asn Arg

1

```

tct gtc atc ggt aca aag caa atg gtc gtc agt ccg cat tac ctg gct    883
Ser Val Ile Gly Thr Lys Gln Met Val Val Ser Pro His Tyr Leu Ala

```

10

20

30

40

| | | | | |
|---|-----|-----|------|----|
| 5 | 10 | 15 | | |
| tct caa gcc gga aac cgc ata cta gac aag gga ggc aac gcg ttt gac | | | 931 | |
| Ser Gln Ala Gly Asn Arg Ile Leu Asp Lys Gly Gly Asn Ala Phe Asp | | | | |
| 20 | 25 | 30 | 35 | |
| gct gct gtt gcg gtg agt gct tgt ctt gcg gtt gtg tat ccg cat atg | | | 979 | |
| Ala Ala Val Ala Val Ser Ala Cys Leu Ala Val Val Tyr Pro His Met | | | | |
| | 40 | 45 | 50 | 10 |
| acc gga ctt ggc ggg gat tcc ttt tgg cta acc ttt cac cag gaa aca | | | 1027 | |
| Thr Gly Leu Gly Gly Asp Ser Phe Trp Leu Thr Phe His Gln Glu Thr | | | | |
| | 55 | 60 | 65 | |
| aag gca gta aaa gtc tac aat ggc agc ggc cgt tca gga aaa aac gta | | | 1075 | |
| Lys Ala Val Lys Val Tyr Asn Gly Ser Gly Arg Ser Gly Lys Asn Val | | | | |
| | 70 | 75 | 80 | |
| acg aga gat gta tat aag gga aaa agc gcg att ccg ctg cgg ggg att | | | 1123 | 20 |
| Thr Arg Asp Val Tyr Lys Gly Lys Ser Ala Ile Pro Leu Arg Gly Ile | | | | |
| | 85 | 90 | 95 | |
| gac agt gcc att acc gtg ccg gga atg gtt gat agc tgg gat gcg gtc | | | 1171 | |
| Asp Ser Ala Ile Thr Val Pro Gly Met Val Asp Ser Trp Asp Ala Val | | | | |
| 100 | 105 | 110 | 115 | |
| ctg aag gag tac ggg cgt ctg tct ctt gca gat gta ttg gag ccc gca | | | 1219 | |
| Leu Lys Glu Tyr Gly Arg Leu Ser Leu Ala Asp Val Leu Glu Pro Ala | | | | 30 |
| | 120 | 125 | 130 | |
| cgc gat tat gcc caa aat ggg ttt cct gta tca gct gat cag tgt cgt | | | 1267 | |
| Arg Asp Tyr Ala Gln Asn Gly Phe Pro Val Ser Ala Asp Gln Cys Arg | | | | |
| | 135 | 140 | 145 | |
| cac aca gaa aag aat att gaa ttg ctg gct tcc acg cct tac acg gct | | | 1315 | |
| His Thr Glu Lys Asn Ile Glu Leu Leu Ala Ser Thr Pro Tyr Thr Ala | | | | |
| | 150 | 155 | 160 | 40 |
| gac atc ttc acg aga agg ggc aaa gca cct gtc ccg gga gag cgg ttt | | | 1363 | |

| | | |
|---|-----|------|
| Asp Ile Phe Thr Arg Arg Gly Lys Ala Pro Val Pro Gly Glu Arg Phe | | |
| 165 | 170 | 175 |
| ttg caa aaa gag ctt gca gac agt ctg aat gtg att gct gaa aaa gga | | 1411 |
| Leu Gln Lys Glu Leu Ala Asp Ser Leu Asn Val Ile Ala Glu Lys Gly | | |
| 180 | 185 | 190 |
| aga agc gca ttt tat gaa gga gat ctc gct cag cgg att gtc tca cat | | 1459 |
| Arg Ser Ala Phe Tyr Glu Gly Asp Leu Ala Gln Arg Ile Val Ser His | | |
| | 200 | 205 |
| 210 | | |
| tta cag aat aac ggc agt tac atg aca atc gat gat ttt aaa gcg cat | | 1507 |
| Leu Gln Asn Asn Gly Ser Tyr Met Thr Ile Asp Asp Phe Lys Ala His | | |
| | 215 | 220 |
| 225 | | |
| cgg ggt gag tgg gca gcg cct gta tca agt gat tat cga gga tac agt | | 1555 |
| Arg Gly Glu Trp Ala Ala Pro Val Ser Ser Asp Tyr Arg Gly Tyr Ser | | |
| | 230 | 235 |
| 240 | | |
| gtg tat cag gcg ccg ccg aat tct cag gga ttt acc ggt tta tta aca | | 1603 |
| Val Tyr Gln Ala Pro Pro Asn Ser Gln Gly Phe Thr Gly Leu Leu Thr | | |
| | 245 | 250 |
| 255 | | |
| ctg aac att ttg gaa aac tat gat ttc acc caa atc gag cac ggt tca | | 1651 |
| Leu Asn Ile Leu Glu Asn Tyr Asp Phe Thr Gln Ile Glu His Gly Ser | | |
| | 260 | 265 |
| 270 | | |
| ttt gag tat tat cat gtg ctt gtg gag gcg ttg aaa aag agt ttt gta | | 1699 |
| Phe Glu Tyr Tyr His Val Leu Val Glu Ala Leu Lys Lys Ser Phe Val | | |
| | 280 | 285 |
| 290 | | |
| gat cgg aat gcc ttt ttg act gac cct gcg ttt gct gac att ccg ctt | | 1747 |
| Asp Arg Asn Ala Phe Leu Thr Asp Pro Ala Phe Ala Asp Ile Pro Leu | | |
| | 295 | 300 |
| 305 | | |
| gaa agg ctt tta gat aaa aat tat gcg aaa cga ttg gcg gga gaa atc | | 1795 |
| Glu Arg Leu Leu Asp Lys Asn Tyr Ala Lys Arg Leu Ala Gly Glu Ile | | |
| | 310 | 315 |
| 320 | | |

10

20

30

40

| | | |
|---|------|----|
| ggc tat ctg gca gaa ccg gca gaa agc agg ccg gtg gga agt gat acg | 1843 | |
| Gly Tyr Leu Ala Glu Pro Ala Glu Ser Arg Pro Val Gly Ser Asp Thr | | |
| 325 330 335 | | |
| gca tat gcg gcc gta atc gat gcg gat ggc aac gca gtg tca ttc att | 1891 | |
| Ala Tyr Ala Ala Val Ile Asp Ala Asp Gly Asn Ala Val Ser Phe Ile | | |
| 340 345 350 355 | | |
| caa agc ctg tac ttt gaa ttt ggc tcg gca gtc act gcc ggt gat aca | 1939 | 10 |
| Gln Ser Leu Tyr Phe Glu Phe Gly Ser Ala Val Thr Ala Gly Asp Thr | | |
| 360 365 370 | | |
| ggc ata tta ctg caa aac cgc gga tca ttt ttc tca ctg gat gaa aat | 1987 | |
| Gly Ile Leu Leu Gln Asn Arg Gly Ser Phe Phe Ser Leu Asp Glu Asn | | |
| 375 380 385 | | |
| cat gtc aac acg ctt gaa ccg aga aag cgc acc ttc cat acg ttg atg | 2035 | |
| His Val Asn Thr Leu Glu Pro Arg Lys Arg Thr Phe His Thr Leu Met | | 20 |
| 390 395 400 | | |
| ccg gct atg gtc tgt aaa ggc gga aag cca aaa att ctg tac ggc aca | 2083 | |
| Pro Ala Met Val Cys Lys Gly Gly Lys Pro Lys Ile Leu Tyr Gly Thr | | |
| 405 410 415 | | |
| caa ggc ggc gaa ggc cag ccg cag acc cag acg gcc atc att acc cga | 2131 | |
| Gln Gly Gly Glu Gly Gln Pro Gln Thr Gln Thr Ala Ile Ile Thr Arg | | |
| 420 425 430 435 | | 30 |
| atg ctg gac tac gga atg cat cca cag cag gca att agc gaa ccg cgc | 2179 | |
| Met Leu Asp Tyr Gly Met His Pro Gln Gln Ala Ile Ser Glu Pro Arg | | |
| 440 445 450 | | |
| tgg gta tgg ggc aga acg tgg gga gag gaa tac gaa ggt ctc aga gtc | 2227 | |
| Trp Val Trp Gly Arg Thr Trp Gly Glu Glu Tyr Glu Gly Leu Arg Val | | |
| 455 460 465 | | |
| gag ggc aga ttc aca gac aaa aca atc caa aaa ctg aaa gac agc ggg | 2275 | 40 |
| Glu Gly Arg Phe Thr Asp Lys Thr Ile Gln Lys Leu Lys Asp Ser Gly | | |

| | | | | |
|---|-----|-----|------|----|
| 470 | 475 | 480 | | |
| cat ctc gtg gag gtt gtc ggt gac tat gat ccg ctg atg gga caa gcg | | | 2323 | |
| His Leu Val Glu Val Val Gly Asp Tyr Asp Pro Leu Met Gly Gln Ala | | | | |
| 485 | 490 | 495 | | |
| gct gca atc aaa gtt gat gaa gaa ggc ttt ctc caa gcc gga gcc gat | | | 2371 | |
| Ala Ala Ile Lys Val Asp Glu Glu Gly Phe Leu Gln Ala Gly Ala Asp | | | | |
| 500 | 505 | 510 | 515 | 10 |
| cct cgg gga gac gga gcg gct gtg ggg ata taa ataactatag ggtacaaata | | | 2424 | |
| Pro Arg Gly Asp Gly Ala Ala Val Gly Ile | | | | |
| 520 | 525 | | | |
| taaatcaaaa gcataaacat aagggagacc tctacaatgt ggtacatata ctgtttatct | | | 2484 | |
| tcaggctctat aatgccactc cataaaaaatt cgtattgagt caatcacaat aaaaaataaa | | | 2544 | |
| agaagcaaat attcaactgg aaaaaaggag agtgaaaata caaacaaaat aagtaaagtg | | | 2604 | |
| atttcgatcc atttgggtgt atttgcigaca tgccttatat gccagccgga tttatcaata | | | 2664 | 20 |
| ccgtatTTTT tctttataaa aaattgagag gcgagactga tggtaatagc gatcagcatt | | | 2724 | |
| aaaatccaaa agtttggcat tccaattcct cctcatctac ctttatacga agaaaaagga | | | 2784 | |
| aaaacgtttc ataaaagaac accccgagct tactctgggt gttctTTTT ttgatTTTT | | | 2844 | |
| ttcagttatt tacaggcgat attttggtaat cataaggctt ttttgactag tttcttctat | | | 2904 | |
| ttaaatagtc ctctcttcca gctgggacga atcagtgatg attcttcccc cagcttggca | | | 2964 | |
| tagtgatttc ccgccaatcg tgaggcaggt tttaatcatt ccgttaaaat atatcccttt | | | 3024 | |
| ctgcatcat acacctttc atctagggtg aagcagacaa ccttccgat gagcagatct | | | 3084 | 30 |
| gctgtagtga tgccttgatc attgtcaaaag gtaatatgcc gctgctaatt tgcactcaaa | | | 3144 | |
| gcgaacgcgg gcttccitaa tgccgggaac tgaacagctt ttgctttcaa caggatgaag | | | 3204 | |
| cgagggtcgt gtaagctcgc tttcatccgg ccttaagctt gcagctgttt cattgatatc | | | 3264 | |
| ttcaatgatg gcttcatcac tgacatgaac gacaaattct ccgttctcca ctgcgtttcg | | | 3324 | |
| cgctgtatct ttttggcgtc ctgtccgtgc ctgttaacag aaatactgag aagcggagga | | | 3384 | |
| ctgagctga cgacgttata aaaactgaaa ggcgcggcat tgaccgctcc tctgaagaa | | | 3444 | |
| agtgttgtca caaatgcaat ggggcgggga aaa | | | 3477 | 40 |

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

gatgagtaca aacaagtaga t 21

<210> 3

<211> 2829

10

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 3

aagctttaca tctcttgggt acttataccc ctactaatca tcaaaaaacc tcttaaaacg 60

aaatctgaag ctcccaattt tctggagctt cgcacaaaaa catacaaaaa aagacacaat 120

ttcaaatgt gtccaatcc tcatcctta catcaatata ticcgggatc ggttcattta 180

atatttctg caccagtgct ttgtaattct ccagctgttc gagatgcggt ttgaactgtt 240 20

cctataaat caaaaatgc tccccgtcat gaacggctct gattttccct tcgagcacca 300

agcttttaat ataactctt gaaagatttg tatattctgc tgtttcttca atcgttaaat 360

acatatagca gtcccttctt aatccgtatg ctgattctaa tatagcacat ggctcatatc 420

aatataatca attttgcaca gaaaaacggc tttatgtact atataatata ccatttgtca 480

cttgtgaaaa cgcgtgaatt tttttacgct aagattgtaa caatacaact tcatatagga 540

gggagaac atg aaa aga acg tgg aac gtc tgt tta aca gct ctg ctt agt 590

Met Lys Arg Thr Trp Asn Val Cys Leu Thr Ala Leu Leu Ser 30

1 5 10

gtt ctg tta gtc gct gga agt gtc cct ttt cac gcg gaa gct aaa aaa 638

Val Leu Leu Val Ala Gly Ser Val Pro Phe His Ala Glu Ala Lys Lys

15 20 25 30

ccg ccc aaa agc tac gat gag tac aaa caa gta gat gtt gga aaa gac 686

Pro Pro Lys Ser Tyr Asp Glu Tyr Lys Gln Val Asp Val Gly Lys Asp

35 40 45 40

ggc atg gtt gcg acc gca cat gct ctt gct tct gaa atc ggt gct gat 734

| | | |
|---|------|-----|
| Gly Met Val Ala Thr Ala His Ala Leu Ala Ser Glu Ile Gly Ala Asp | | |
| 50 | 55 | 60 |
| gtg ctg aaa aaa gga gga aat gct att gac gca gcg gtt gcc att caa | 782 | |
| Val Leu Lys Lys Gly Gly Asn Ala Ile Asp Ala Ala Val Ala Ile Gln | | |
| 65 | 70 | 75 |
| ttt gca ctc aat gta aca gag ccg atg atg tca ggt att ggc ggc ggc | 830 | |
| Phe Ala Leu Asn Val Thr Glu Pro Met Met Ser Gly Ile Gly Gly Gly | | 10 |
| 80 | 85 | 90 |
| ggt ttt atg atg gtg tat gac gga aaa acg aag gat aca acg ata atc | 878 | |
| Gly Phe Met Met Val Tyr Asp Gly Lys Thr Lys Asp Thr Thr Ile Ile | | |
| 95 | 100 | 105 |
| gac agc cgt gag cgt gct cca gca ggc gca act cct gat atg ttt ctg | 926 | |
| Asp Ser Arg Glu Arg Ala Pro Ala Gly Ala Thr Pro Asp Met Phe Leu | | |
| 115 | 120 | 125 |
| gac gaa aac ggc aaa gca att cct ttc tct gaa cgt gta aca aaa ggt | 974 | |
| Asp Glu Asn Gly Lys Ala Ile Pro Phe Ser Glu Arg Val Thr Lys Gly | | |
| 130 | 135 | 140 |
| act gcc gtt ggt gtt cca ggc act ctg aaa ggg ctg gaa gaa gcc ttg | 1022 | |
| Thr Ala Val Gly Val Pro Gly Thr Leu Lys Gly Leu Glu Glu Ala Leu | | |
| 145 | 150 | 155 |
| gac aaa tgg gga acc cgt tcg atg aag cta tta att acc cct tct att | 1070 | 30 |
| Asp Lys Trp Gly Thr Arg Ser Met Lys Leu Leu Ile Thr Pro Ser Ile | | |
| 160 | 165 | 170 |
| aaa ctc gct gaa aaa ggc ttt ccg att gat tcg gtg ttg gca gat gcc | 1118 | |
| Lys Leu Ala Glu Lys Gly Phe Pro Ile Asp Ser Val Leu Ala Asp Ala | | |
| 175 | 180 | 185 |
| att tct gat tat cag gaa aaa ctt tca cgg act gcc gca aaa gat gta | 1166 | |
| Ile Ser Asp Tyr Gln Glu Lys Leu Ser Arg Thr Ala Ala Lys Asp Val | | 40 |
| 195 | 200 | 205 |

| | | |
|---|------|----|
| ttt tta cca aat ggc gaa ccg ctt aaa gaa gga gat acc ctt att caa | 1214 | |
| Phe Leu Pro Asn Gly Glu Pro Leu Lys Glu Gly Asp Thr Leu Ile Gln | | |
| 210 215 220 | | |
| aag gat ttg gct aaa aca ttt aag ctt att cgc tcc aaa ggc act gac | 1262 | |
| Lys Asp Leu Ala Lys Thr Phe Lys Leu Ile Arg Ser Lys Gly Thr Asp | | |
| 225 230 235 | | |
| gct ttt tat aaa gga aaa ttc gcc aag acg ctt tct gac act gtc cag | 1310 | 10 |
| Ala Phe Tyr Lys Gly Lys Phe Ala Lys Thr Leu Ser Asp Thr Val Gln | | |
| 240 245 250 | | |
| gat ttc ggc gga tca atg aca gaa aaa gat tta gaa aat tac gac att | 1358 | |
| Asp Phe Gly Gly Ser Met Thr Glu Lys Asp Leu Glu Asn Tyr Asp Ile | | |
| 255 260 265 270 | | |
| aca att gat gaa ccg att tgg gga gac tat caa ggc tat caa atc gct | 1406 | |
| Thr Ile Asp Glu Pro Ile Trp Gly Asp Tyr Gln Gly Tyr Gln Ile Ala | | 20 |
| 275 280 285 | | |
| act act cct cct cca agc tcc ggc ggt att ttc tta ttg caa atg ctg | 1454 | |
| Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Gly Ile Phe Leu Leu Gln Met Leu | | |
| 290 295 300 | | |
| aaa atc ctt gat gat ttt aac ctt tca caa tac gat gtc cgc tca tgg | 1502 | |
| Lys Ile Leu Asp Asp Phe Asn Leu Ser Gln Tyr Asp Val Arg Ser Trp | | |
| 305 310 315 | | 30 |
| gaa aaa tat cag ctg ctt gct gaa acg atg cat ttg tca tat gcc gac | 1550 | |
| Glu Lys Tyr Gln Leu Leu Ala Glu Thr Met His Leu Ser Tyr Ala Asp | | |
| 320 325 330 | | |
| cgt gcg tct tac gca ggt gat ccc gaa ttt gta aat gtt cct ctc aaa | 1598 | |
| Arg Ala Ser Tyr Ala Gly Asp Pro Glu Phe Val Asn Val Pro Leu Lys | | |
| 335 340 345 350 | | |
| ggc ctg ctt cac ccc gat tat att aaa gaa cgc cag caa tta atc aac | 1646 | 40 |
| Gly Leu Leu His Pro Asp Tyr Ile Lys Glu Arg Gln Gln Leu Ile Asn | | |

| | | | | |
|---|-----|-----|-----|------|
| | 355 | 360 | 365 | |
| cta gat caa gtg aat aaa aaa ccg aaa gcc ggt gac cct tgg aaa tac | | | | 1694 |
| Leu Asp Gln Val Asn Lys Lys Pro Lys Ala Gly Asp Pro Trp Lys Tyr | | | | |
| | 370 | 375 | 380 | |
| caa gaa gga tca gca aac tat aaa caa gtt gaa cag ccg aaa gac aaa | | | | 1742 |
| Gln Glu Gly Ser Ala Asn Tyr Lys Gln Val Glu Gln Pro Lys Asp Lys | | | | |
| | 385 | 390 | 395 | 10 |
| gta gaa ggc caa aca acc cac ttt aca gtt gct gat cga tgg gga aat | | | | 1790 |
| Val Glu Gly Gln Thr Thr His Phe Thr Val Ala Asp Arg Trp Gly Asn | | | | |
| | 400 | 405 | 410 | |
| gtt gtt tct tac aca aca aca atc gaa cag cta ttc gga acg ggt att | | | | 1838 |
| Val Val Ser Tyr Thr Thr Thr Ile Glu Gln Leu Phe Gly Thr Gly Ile | | | | |
| | 415 | 420 | 425 | 430 |
| atg gtc cct gat tac ggt gtt att tta aac aat gaa tta acg gat ttt | | | | 1886 |
| Met Val Pro Asp Tyr Gly Val Ile Leu Asn Asn Glu Leu Thr Asp Phe | | | | 20 |
| | 435 | 440 | 445 | |
| gat gcg ata cca ggc gga gct aac gaa gta cag cca aac aaa cgg cct | | | | 1934 |
| Asp Ala Ile Pro Gly Gly Ala Asn Glu Val Gln Pro Asn Lys Arg Pro | | | | |
| | 450 | 455 | 460 | |
| tta agc agc atg acc ccg acg att tta ttt aag gat gac aag cct gtc | | | | 1982 |
| Leu Ser Ser Met Thr Pro Thr Ile Leu Phe Lys Asp Asp Lys Pro Val | | | | 30 |
| | 465 | 470 | 475 | |
| ctc act gtt gga tct cct ggc ggg gcc aca att att tca tcc gtt ttg | | | | 2030 |
| Leu Thr Val Gly Ser Pro Gly Gly Ala Thr Ile Ile Ser Ser Val Leu | | | | |
| | 480 | 485 | 490 | |
| caa acc att ctc tac cac att gaa tat ggt atg gaa tta aaa gca gct | | | | 2078 |
| Gln Thr Ile Leu Tyr His Ile Glu Tyr Gly Met Glu Leu Lys Ala Ala | | | | |
| | 495 | 500 | 505 | 510 |
| gtt gaa gag ccg aga att tac aca aac agt atg agc tct tac cgt tac | | | | 2126 |
| | | | | 40 |

した γ -ポリグルタミン酸試料 (10 μ L) を、それぞれ表す。

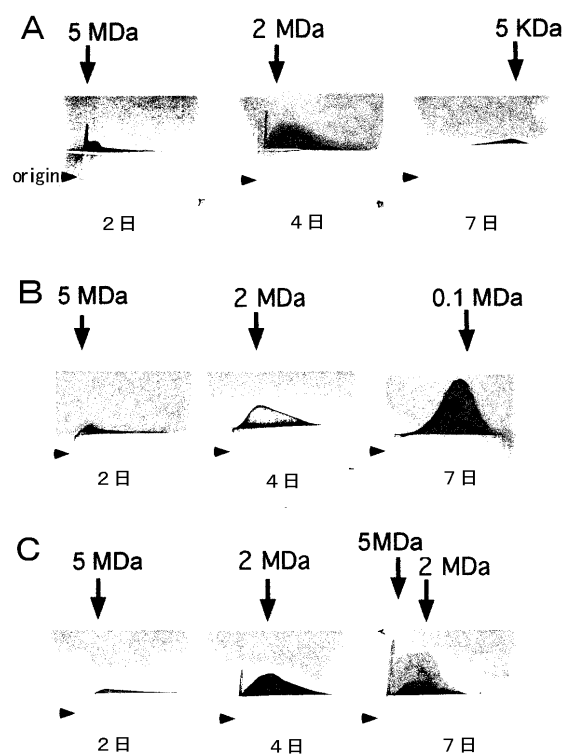
【図2】 2次元免疫電気泳動終了後の γ -ポリグルタミン酸の泳動像を示したものである。図中、Aは野生型納豆菌の培養物から得た γ -ポリグルタミン酸を、Bは γ -グルタミルトランスペプチダーゼ遺伝子欠損変異株の培養物から得た γ -ポリグルタミン酸を、Cは γ -グルタミルトランスペプチダーゼ遺伝子及び γ -ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ遺伝子欠損変異株の培養物から得た γ -ポリグルタミン酸を、それぞれ表す。

【図3】 相補性試験に用いるアミラーゼ遺伝子 (amyE) 座位インテグレーション用ベクターの模式図である。

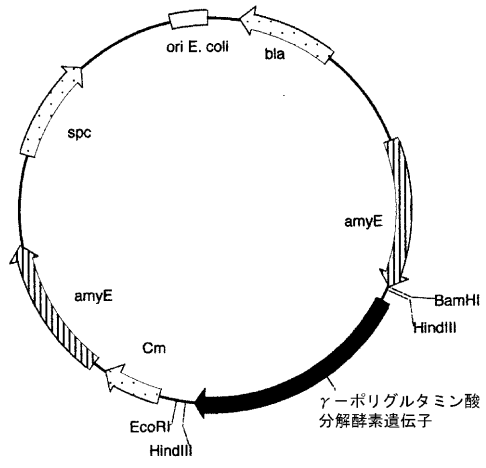
【図1】



【図2】



【 図 3 】



フロントページの続き

(72)発明者 伊藤 義文
茨城県つくば市並木3丁目14-18

審査官 田村 明照

(56)参考文献 特開平05-304958(JP,A)
Bioresour. Technol. , 2001年, Vol. 79, 207-225
Biosci. Biotech. Biochem. , 1997年, Vol. 61 No. 9, 1596-1600
Mol. Microbiol. , 1993年, Vol. 9 No. 3, 487-496
J. Bacteriol. , 1996年, Vol. 178 No. 14, 4319-4322
Nature , 1997年, Vol. 390, 249-256
Sonenshein, A. L. et al. edited, Bacillus subtilis and its Closest Relatives, ASM Press, 2001年, 1st edn, 245-254
Appl. Environm. Microbiol. , 2001年, Vol. 67 No. 2, 1004-1007
Appl. Microbiol. Biotechnol. , 2001年, Vol. 57, 764-769
Microbiol. , 1998年, Vol. 144, 3097-3104

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

C12N 15/00-15/90
C12N 1/20
C12P 21/00
C12N 1/20 //
C12R 1:125
JSTPlus(JOIS)
GenBank/DDBJ/EMBL/Geneseq
SwissProt/PIR/Geneseq
PubMed