

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2003-230384
(P2003-230384A)

(43) 公開日 平成15年8月19日 (2003.8.19)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 1/20	A 4 B 0 2 4
1/20		C 1 2 P 21/00	4 B 0 6 4
C 1 2 P 21/00		C 1 2 R 1:125	4 B 0 6 5
// (C 1 2 N 1/20		C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 R 1:125)			

審査請求 有 請求項の数15 OL (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2002-30237(P2002-30237)	(71) 出願人	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)	(71) 出願人	302001446 木村 啓太郎 茨城県つくば市竹園三丁目302-906
		(71) 出願人	598035244 伊藤 義文 茨城県つくば市並木3丁目14-18
		(74) 代理人	100074077 弁理士 久保田 藤郎 (外1名)

最終頁に続く

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

(57) 【要約】

【課題】 - ポリグルタミン酸を高い収量で安定的に生産することができ、得られた - ポリグルタミン酸が酵素分解されることなく、その分子量分布が一定の範囲である、 - ポリグルタミン酸生産微生物と、その取得方法並び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。

【解決手段】 - 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の変異していることを特徴とする - ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株、 - ポリグルタミン酸ヒドラーゼ遺伝子の変異していることを特徴とする - ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株と、 - 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ラーゼ遺伝子の変異していることを特徴とする - ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株、並びにそれらの取得方法及び当該微生物を用いる - ポリグルタミン酸の製造法。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 - 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の変異していることを特徴とする - ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株。

【請求項 2】 - 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にスペクチノ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 M13 株 (FERM P - 18687) である請求項 1 記載の変異株。

【請求項 3】 - ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株が、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に変異を誘起したバチルス・ズブチリス NAF M5 - 001 株 (FERM P - 18694) である請求項 1 記載の変異株。

【請求項 4】 - ポリグルタミン酸生産微生物において、 - ポリグルタミン酸ハイドラーゼ遺伝子の変異していることを特徴とする - ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株。

【請求項 5】 - ポリグルタミン酸生産微生物が、 - ポリグルタミン酸ハイド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 M60 株 (FERM P - 18696) である請求項 4 記載の変異株。

【請求項 6】 - 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 - ポリグルタミン酸ハイドラーゼ遺伝子の変異していることを特徴とする - ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株。

【請求項 7】 - 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 - ポリグルタミン酸ハイド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 6 記載の変異株。

【請求項 8】 - ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株が、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) である請求項 6 記載の変異株。

【請求項 9】 請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の - 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。

【請求項 10】 配列表の配列番号 1 記載の塩基配列からなる - ポリグルタミン酸ハイドラーゼ遺伝子。

【請求項 11】 配列表の配列番号 2 記載のオリゴ DN

A プローブを用いてバチルス・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クローニングし、当該遺伝子の Stu I 部位にスペクチノマイシン耐性遺伝子を挿入することを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の - ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株の取得方法。

【請求項 12】 - ポリグルタミン酸生産微生物を化学物質による化学的変異処理もしくは紫外線等の照射による物理的変異処理を行い、 - グルタミルトランスぺプチダーゼ遺伝子を変異させることを特徴とする請求項 1 又は 3 記載の - ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株の取得方法。

【請求項 13】 配列表の配列番号 4 記載のオリゴ DNA プローブを用いてバチルス・ズブチリスのゲノム DNA ライブラリーから - ポリグルタミン酸ハイドラーゼ遺伝子をクローニングし、当該遺伝子の 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を特徴とする請求項 4 又は 5 記載の - ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株の取得方法。

【請求項 14】 配列表の配列番号 2 記載のオリゴ DNA プローブを用いてバチルス・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クローニングし、配列表の配列番号 4 記載のオリゴ DNA プローブを用いてバチルス・ズブチリスのゲノム DNA ライブラリーから - ポリグルタミン酸ハイドラーゼ遺伝子をクローニングし、前者の遺伝子の Stu I 部位にスペクチノマイシン耐性遺伝子を挿入し、後者の遺伝子の 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を特徴とする請求項 6 又は 7 記載の - ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株の取得方法。

【請求項 15】 - ポリグルタミン酸生産微生物を化学物質による化学的変異処理もしくは紫外線等の照射による物理的変異処理を行い、 - 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ラーゼ遺伝子を変異させることを特徴とする請求項 6 又は 8 記載の - ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株の取得方法。

【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、その取得法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、 γ -ポリグルタミン酸は納豆の糸引きの主成分であり、 γ -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、 γ -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、 γ -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。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】上記したように、 γ -ポリグルタミン酸生産微生物を用いる γ -ポリグルタミン酸の製造法は、生産された γ -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、 γ -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。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明の目的は、 γ -ポリグルタミン酸の収量が多く、しかも得られる γ -ポリグルタミン酸の分子量分布が一定の範囲となり、 γ -ポリグルタミン酸の安定な生産が可能な γ -ポリグルタミン酸生産微生物を提供すると共に、その取得方法並びに当該微生物を用いる γ -ポリグルタミン酸の製造法を提供することである。

【0005】本発明者らは、上記の目的を達成すべく、納豆菌の γ -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。その過程で、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (以下、GGTと略記することもある。) を欠損する変異株が γ -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 γ -ポリグルタミン酸をエンド型に分解する新規な酵素 (γ -ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ) の遺伝子を発見し、当該遺伝子を pghA と命名した。さらに、GGT 遺伝子及びノ又は 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、 γ -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 γ -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。

【0006】すなわち、請求項1記載の本発明は、 γ -ポリグルタミン酸生産微生物において、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ遺伝子が変異していることを特徴とする γ -ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株であ

る。請求項2記載の本発明は、 γ -ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株が、 γ -グルタミルトランスペ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たバチルス・ズブチリスNAF M13株 (FERM P-18687) である請求項1記載の変異株である。請求項3記載の本発明は、 γ -ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株が、化学的変異処理もしくは物理的変異処理により γ -グルタミルトランスペプチダーゼ遺伝子に変異を誘起したバチルス・ズブチリスNAF M5-001株 (FERM P-18694) である請求項1記載の変異株である。

【0007】請求項4記載の本発明は、 γ -ポリグルタミン酸生産微生物において、 γ -ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ遺伝子が変異していることを特徴とする γ -ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株である。請求項5記載の本発明は、 γ -ポリグルタミン酸生産微生物が、 γ -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バチルス・ズブチリスNAF M60株 (FERM P-18696) である請求項4記載の変異株である。

【0008】請求項6記載の本発明は、 γ -ポリグルタミン酸生産微生物において、 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が変異していることを特徴とする γ -ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株である。請求項7記載の本発明は、 γ -ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株が、 γ -グルタミルトランスペ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 γ -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バチルス・ズブチリスNAF M61株 (FERM P-18688) である請求項6記載の変異株である。請求項8記載の本発明は、 γ -ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株が、化学的変異処理もしくは物理的変異処理により 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) である請求項6記載の変異株である。

【0009】請求項9記載の本発明は、請求項1~8のいずれかに記載の γ -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 γ -ポリグルタミン酸を採取することを特徴とする γ -ポリグルタミン酸の製造法である。

【0010】請求項10記載の本発明は、配列表の配列番号1記載の塩基配列からなる γ -ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ遺伝子である。

【0011】請求項11記載の本発明は、配列表の配列番号2記載のオリゴDNAプローブを用いてバチルス・ズブチリスのゲノムDNAライブラリーから γ -グルタミルトランスペプチダーゼ遺伝子をクローニングし、当

該遺伝子のStu I 部位にスペクチノマイシン耐性遺伝子を挿入することを特徴とする請求項1又は2記載の - ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株の取得方法である。請求項12記載の本発明は、 - ポリグルタミン酸生産微生物を化学物質による化学的変異処理もしくは紫外線等の照射による物理的変異処理を行い、 - グルタミルトランスぺプチダーゼ遺伝子を変異させることを特徴とする請求項1又は3記載の - ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株の取得方法である。

【0012】請求項13記載の本発明は、配列表の配列番号4記載のオリゴDNAプローブを用いてバチルス・ズブチリスのゲノムDNAライブラリーから - ポリグルタミン酸ハイドロラーゼ遺伝子をクローニングし、当該遺伝子の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を特徴とする請求項4又は5記載の - ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株の取得方法である。

【0013】請求項14記載の本発明は、配列表の配列番号2記載のオリゴDNAプローブを用いてバチルス・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クローニングし、配列表の配列番号4記載のオリゴDNAプローブを用いてバチルス・ズブチリスのゲノムDNAライブラリーから - ポリグルタミン酸ハイドロラーゼ遺伝子をクローニングし、前者の遺伝子のStu I 部位にスペクチノマイシン耐性遺伝子を挿入し、後者の遺伝子の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を特徴とする請求項6又は7記載の - ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株の取得方法である。請求項15記載の本発明は、 - ポリグルタミン酸生産微生物を化学物質による化学的変異処理もしくは紫外線等の照射による物理的変異処理を行い、 - 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を変異させることを特徴とする請求項6又は8記載の - ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株の取得方法である。

【0014】

【発明の実施の形態】本発明の請求項1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の変異している微生物である。当該変異株は、 - グルタミルトランスぺプチダーゼ遺伝子の変異しており、 - 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活性を持っていない。そのため、当該微生物によって生産された - ポリグルタミン酸は、グルタミン酸に分解されず、培養物中に蓄積されるので、目的とする - 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。なお、この変異株によって生産される - ポリグルタミン酸は、分子量が約10万ダルトン(0.1MDa)である。

【0015】また、本発明の請求項4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、 - ポリグルタミン酸ハイドロラーゼ遺伝子の変異していることを特徴とする - ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株である。この変異株は、エンド型の - ポリグルタミン酸分解酵素である - ポリグルタミン酸ハイドロラーゼ活性を持たない。そのため、培養物中に生産された - ポリグルタミン酸の急激な低分子化は起こらない。しかしながら、 - ポリグルタミルトランスぺプチダーゼ活性を持っているため、生産された - ポリグルタミン酸は徐々に低分子化し、一部は消失する。そのため、この変異株を用いて得られる - ポリグルタミン酸の分子量分布は、500万ダルトン(5MDa)から5000ダルトン(5kDa)まで広い範囲に分布する。

【0016】本発明の請求項6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 - ポリグルタミン酸ハイ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 - ポリグルタミルトランスぺプチダーゼの両者を欠損している。当該変異株も、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。

【0017】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ピオチンを含む)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pton 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。

【0018】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・ズブチリスやバチルス・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ように、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. Microbiol., 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)。

【0019】 - 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。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ペ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ペ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。 - 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суль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。

【0020】 - グルタミルトランスペ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ペプチダーゼの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

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)

【0024】上記の - グルタミルトランスペ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ペ

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 (アマーシャム 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ペプチダーゼ遺伝子を選抜する。この - グルタミルトランスペ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。

【0021】次に、 - グルタミルトランスペ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。クローニングした - グルタミルトランスペ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ペ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ペプチダーゼ遺伝子欠損変異株を選抜する。

【0022】 - グルタミルトランスペ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。

【0023】

プチダ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 M13株と命名した。本菌は、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、受託番号FERM P-18687として寄託されている。

【0025】次に、 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の1例を以下に示す。まず、 γ -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、上記のパチルス・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 γ -ポリグルタミン酸ヒドロラーゼと、それぞれ命名した。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 γ -ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ遺伝子に包含される。

【0026】上記によって単離した γ -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。このプラスミドを用いて、定法によりパチルス・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 γ -ポリグルタミン酸の分解能を指標に、 γ -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。

【0027】 γ -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。変異処理したパチルス・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、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。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 γ -ポリグルタミン酸を沈殿させる(Nagai et al., J. Gne. Appl. Microbiol. 43, 139-143, 1997)。

【0028】得られた γ -ポリグルタミン酸を400 μ Lのリン酸緩衝液に溶解し、10 μ Lを1%アガロース電気泳動(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、アガロース上に展開した γ -グルタミン酸を染色し、検出する。 γ -ポリグルタミン酸が分解されていれば、低分子化した γ -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、 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、これをパチルス・ズブチリスNAF M60株と命名した。本菌は、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受託番号FERM P-18696として寄託されている。

【0029】また、 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が共に変異している γ -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。 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ遺伝子又は γ -ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ遺伝子の欠損変異株を作成した後に、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 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ遺伝子又は γ -ポリグルタミン酸ヒ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NAF M61株、NAF M5-005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FERM P-18688、FERM P-18695として寄託されている。

【0030】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、EMSを使用する場合を例として説明すると、納豆菌などの γ -ポリグルタミン酸生産菌の培養物にEMS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LB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 γ -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。 γ -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、3、4、6及び8に記載の変異株を取得することができる。

【0031】本発明に係る変異株を用いて γ -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 γ -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分間当たり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、 γ -ポリグルタミン酸の生産を増大することができる。

【0032】次に、 γ -ポリグルタミン酸の製造例を示す。 γ -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、0.5mg/Lピオチン）や栄養培地であるGSP培地（1.5%グルコース、1.5%L-グルタミン酸、1.5%フィトプトン）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、 γ -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、 γ -ポリグルタミン酸を大量に生産させることができる。

【0033】本発明の γ -ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株は、 γ -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 γ -ポリグルタミン酸は分解されない。そのため、 γ -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。培養物からの γ -ポリグルタミン酸の採取は、1M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、 γ -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 γ -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、HPLC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。

【0034】本発明により得られる γ -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。

【0035】

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

培養上清	50 μ L
1 mM γ -グルタミルパラニトロアニリド	250 μ L

実施例1（ γ -グルタミルトランスペ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 γ -グルタミルトランスペプチダーゼの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 γ -グルタミルトランスペ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。この γ -グルタミルトランスペ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、 γ -グルタミルトランスペ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。

【0036】クローニングした γ -グルタミルトランスペ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）、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼの酵素活性を指標として、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ遺伝子欠損変異株を選抜した。本菌をバチルス・ズブチリスNAF M13株（FERM P-18687）と命名した。

【0037】 γ -ポリグルタミルトランスペプチダーゼの酵素活性の測定は、発色基質である γ -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1 μ 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 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ活性を測定した。

【0038】

1 M トリス塩酸緩衝液
滅菌脱イオン水
(合計)

50 μ L
200 μ L
550 μ L)

【0039】実施例2 (γ -グルタミルトランスペ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で一晩培養した。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、実施例1と同様に、 γ -グルタミルパラニトロアニドを基質に用いて、 γ -グルタミルトランスペ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NAFM5-001株 (FERM P-18694)と命名した。

【0040】

【表1】表1

菌 株	γ -ポリグルタミルトランスペプチダーゼ活性
野生型納豆菌	35 mU/mL
実施例1の分解酵素欠損変異株	< 0.01 mU/mL
実施例2の分解酵素欠損変異株	< 0.01 mU/mL

【0041】表1から明らかなように、実施例1、2によって得られた γ -グルタミルトランスペプチダーゼ遺伝子に変異を導入して得た変異株は、 γ -グルタミルトランスペ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、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ遺伝子に変異を誘起できることが示された。

【0042】実施例3 (γ -ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ遺伝子の調製)

γ -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、実施例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 (ABI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DDBJ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pghA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 γ -ポリグルタミン酸ヒドロラーゼと命名した。

【0043】実施例4 (γ -ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ欠損変異株の取得方法)

実施例3で調製した γ -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 γ -ポリグルタミン酸分解能を指標に、 γ -ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ欠損変異株を取得した。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 μ g/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。

【0044】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、0.5 mg/Lビオチン) 2 mLに接種し、7日間培養した。培養後、遠心分離 (6000 rpm)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5 M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. Gen. Appl. Microbiol. 43, 139-143, 1997)。

【0045】得られた γ -ポリグルタミン酸を400 μ Lのリン酸緩衝液に溶解し、10 μ Lを1%アガロース電気泳動 (20 V/cm, 30分)に供する。泳動動、メチレンブルー (pH 9.5の30%エタノールに溶解)にて、アガロース上に展開した 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。また、実施例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。

【0046】実施例5 (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、実施例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

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	35 mU/mL
実施例1の欠損変異株	< 0.01 mU/mL
実施例2のEMS処理欠損変異株	< 0.01 mU/mL
実施例5の欠損変異株	< 0.01 mU/mL
実施例5のEMS処理欠損変異株	< 0.01 mU/mL

【0048】この結果、実施例5で得られた欠損変異株は、実施例1、2で得られた欠損変異株と同様に、 γ -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、 γ -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。

【0049】実施例6 (γ -ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株を用いた γ -ポリグルタミン酸の大量生産) 実施例5で得た 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欠損変異株を、前記最小培地あるいはGSP培地100mL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実施例1で得た γ -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(6000rpm)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 γ -ポリグルタミン酸を沈殿させた後、遠心分離(12000rpm)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 γ -ポリグルタミン酸を得た。

【0050】上記の γ -ポリグルタミン酸について、抗 γ -ポリグルタミン酸(PGA)血清を用いた2次元免疫電気泳動法(Uchida et al., Mol. Microbiol., 9:48

た、実施例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。得られた形質転換体について、実施例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、また実施例3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 (FERMP-18688)及びNAF M5-005株 (FERM P-18695)を得た。結果を表2に示す。図1は、アガロース電気泳動を行った電気泳動像を示したものである。

【0047】
【表2】表2

7-496, 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、2次元目は10%(v/v)の抗PGA血清(Uchida et al., Mol. Microbiol., 9:487-496, 1993)を含む1.2%アガロース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 γ -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 γ -ポリグルタミン酸の泳動像である。また、精製した γ -ポリグルタミン酸を試料としてHPLCに供し、生産された γ -ポリグルタミン酸の濃度と分子量を求めた(Nagai et al., J. Gne. Appl. Microbiol. 43, 139-143, 1997)。HPLCで用いたカラムはAsahipack GAF-7M(昭和電工社製)であり、溶媒(50mMリン酸ナトリウム、100mM硫酸ナトリウム、pH6.8)、流速0.6ml/分の条件で実施した。

【0051】野生型納豆菌を用いて生産された γ -ポリグルタミン酸は、当該納豆菌によって産生される γ -ポリグルタミン酸分解酵素(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)により分解されるため、得られる γ -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、実施例1で得た γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ欠損変異株NAFM13 (FERM P-18687)によって生産される γ -ポリグルタミン酸は、 γ -

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10万ダルトン(0.1MDa)の - ポリグルタミン酸となることが明らかとなった。

【0052】実施例5で得た - グルタミルトランスペプチダーゼ及び - ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ遺伝子の欠損変異株NAF M61株(FERM P-18688)及びNAF M5-005株(FERM P-18695)によって生産される - ポリグルタミン酸は、 - グルタミルトランスペプチダーゼ及び - 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200万ダルトン(2MDa)の - 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、 - 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 - ポリグルタミン酸は、 - グルタミルトランスペ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。

【0053】図2から明らかのように、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ペ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ペ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。

【0054】実施例7(- 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)
実施例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ペプチダーゼ遺伝子、 - 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、実施例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ペプチダーゼ遺伝子(Ssp I-Bgl II断片)及び実施例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。

【0055】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を原因とすることを判定する。

【0056】 - グルタミルトランスペプチダーゼ遺伝子欠損変異株の相補性試験は、実施例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ペ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ペプチダーゼ遺伝子の変異であることが証明できる。

【0057】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、実施例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電気泳動法により行った。アガロース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。

【0058】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ペプチダーゼ遺伝子(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。

【0059】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。

【0060】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 - ポリグルタミン酸ハイ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。

【0061】

【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、系引きが強く、粘りのあるため、納豆の製造に利用することができる。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0.1MDa、2MDaの - ポリグルタミン酸が得られるので、それぞれの性質に応じた用途に使用することができる。

【0062】 - 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。

【0063】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<;110>; 独立行政法人 食品総合研究所
 <;120>; - ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株、その取得法及び該変異株を用いた - 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 cttcatggcg gatcagcgga atcacggaag gtcgcccggc 60
 gaacccta atgccggtgc gaaccattgc ggccgtcata tcccgataag gatggttttt 120
 cattcgtttc tctcctttac agcttcattc ccatacggct tttgtatcgt ttgatcagca 180
 tctggcaatc aacactgacg acgcctcgca atggatacag ccgttttggt aaaaattctt 240
 ccatttcttg atcgttggca aagatccat gcatatgcag ctgtctcggg cctgtcatgt 300
 gataaaggct ggtgaccgca ggctcttctt caagcttaag agcgacctct tctaaaaatt 360
 gcggttctac ctcgacattg aaaaacacgg aaacatgaat gccgatttta gcgggattga 420
 tgacagcggg gaatttttca ataacaccgg cttcaattaa ttggttgata cgggcctgca 480
 cggcgaccgg tgacaaatcg actcttttgc caagatccgt ataagaaatt ctgccttctt 540
 catgcaaaat cgtgagaatt tgtttatcag tctcatcaag tacaaggttg gggatttgat 600
 atcatgact caattgctcc acctgctttc gtagcctttt agcaatcatt ttatcacaaa 660
 agttacgtat cgaataata atttttcatt tgttttcgaa atgaacgaaa aaatatcttg 720
 ttatttgca aaagtagaaa gttcgtcagt ttttctgccg gatcagtaga tgtgaaaaat 780
 caggctccct atactgaaga aaatttctta aaaaagggga cttgtg atg aac aga 835
 Met Asn Arg
 1
 tct gtc atc ggt aca aag caa atg gtc gtc agt ccg cat tac ctc gct 883
 Ser Val Ile Gly Thr Lys Gln Met Val Val Ser Pro His Tyr Leu Ala
 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

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
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	
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	
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	
180 185 190 195	
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	
260 265 270 275	
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
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
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
          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
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
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 ccg   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
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 aaggagacc tctacaatgt ggtacatata ctgtttatct 2484
tcagggtctat aatgccactc cataaaaatt cgtattgagt caatcacaat aaaaaataaa 2544
agaagcaaat attcaactgg aaaaaaggag agtgaaaata caaacaaaat aagtaaagtg 2604
atctcgatcc atttgtgtgt attgctgaca tgcttatatc gccagccgga ttatcaata 2664
ccgtatTTTT tctttataaa aaattgagag gcgagactga tggtaatagc gatcagcatt 2724
aaaatcaaaa agtttgtcat tccaattcct cctcatctac ctttatacga agaaaaagga 2784
aaaacgtttc ataaaagaac accccgagct tactctgggt gttctttttt ttgatatttt 2844
ttcagttatt tacaggcgat attttgaat cataaggctt tttgactag tttcttctat 2904
ttaaatagtc cttctcttca gctgggacga atcagtgatg attcttcccc cagcttgcca 2964
tagtgatttc ccgccaatcg tgaggcaggt ttaattcat ccgttaaaa atacccttt 3024

```

```

tctgcatcat acaccttttc atctaggtagg aagcagacaa cccttccgat gagcagatct 3084
gctgtagtga tgccttgatc attgtcaaag gtaatatgcc gctgctaatt tgcactcaaa 3144
gcgaacgagg gcttccttaa tgccgggaac tgaacagct ttgctttcaa caggatgaag 3204
cgaggtagct gtaagctcgc tttcatccgg ccttaagcct gcagctgttt cattgatatc 3264
ttcaatgatg gcttcatcac tgacatgaac gacaaattct ccgttctcca ctgctgttcg 3324
cgctgtatct ttttggcgtc ctgcccgtgc ctgttaacag aaatactgag aagcggagga 3384
tctgagctga cgacgttata aaaactgaaa ggcgaggcat tgaccgctcc tctgaagaa 3444
agtgtgtca caaatgcaat gggcgggga aaa 3477
<;210>; 2
<;211>; 21
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;400>; 2
gatgagtaca aacaagtaga t 21
<;210>; 3
<;211>; 2829
<;212>; DNA
<;213>; Bacillus subtilis
<;400>; 3
aagctttaca tctcttgggt acttatcccc ctactaatca tcaaaaaacc tcttaaaacg 60
aaatctgaag ctccaatft tctggagcct ccgcaaaaaa catacaaaaa aagacacaat 120
ttcaaattgt gtcctaatac tcatccttta catcaatata tccgggatc ggttcattta 180
atatttctcg caccagtgtc ttgtaattct ccagctgttc gagatgcttt ttgaactggt 240
ccttataaat caaaaattgc tccccgtcat gaacggctct gattttccct tcgagacca 300
agcttttaat ataactctct gaaagatttg tatattctgc tgtttcttca atcgttaaat 360
acatatagca gtcccttctt aatccgtatg ctgattctaa tatagcacat ggctcatatc 420
aatataatca atttgcaca gaaaaacggc tttatgtact atataatata ccatttgta 480
cttgtgaaaa cgctgtaatt 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
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
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
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
95 100 105 110
gac agc cgt gag cgt gct cca gca ggc gca act cct gat atg ttt ctg 926

```


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
 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
 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
 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
 Val Glu Glu Pro Arg Ile Tyr Thr Asn Ser Met Ser Ser Tyr Arg Tyr
 515 520 525
 gaa gac gga gtt cct aaa gat gtc ctc agc aag ctg aac ggt atg ggc 2174
 Glu Asp Gly Val Pro Lys Asp Val Leu Ser Lys Leu Asn Gly Met Gly
 530 535 540
 cac aaa ttc ggc aca agt ccg gtg gat atc gga aac gtg caa agc ata 2222
 His Lys Phe Gly Thr Ser Pro Val Asp Ile Gly Asn Val Gln Ser Ile
 545 550 555
 tcg atc gac cat gaa aac gga acc ttt aaa ggc gta gct gat tca agc 2270
 Ser Ile Asp His Glu Asn Gly Thr Phe Lys Gly Val Ala Asp Ser Ser
 560 565 570
 aga aac ggc gcg gcg atc ggc att aat tta aaa cgt aaa taa attaaaaa 2321
 Arg Asn Gly Ala Ala Ile Gly Ile Asn Leu Lys Arg Lys
 575 580 585
 ctgtactcgc ttcaaatgag tacagttttt tcatgcagat cttaacatta ccgatgagat 2381
 cgcgccgaga gtcggtgttt ggtaggctc cggtatcgga ggacttgaaa cactagagtc 2441
 tcaatttgaa atcttcttaa caaaaggctc aagacgggta agcccgtttt tcgtgccaat 2501
 gatgattcct gacatggcga caggccagat ttctattgca ttaggagcaa aaggggtgaa 2561
 ctctttagc gttacagcat gtgctacagg aacgaactcc atcggtgacg cgtttaaggt 2621
 tattcagcgc ggtgatgcag acgtgatggt cacaggcggga acagaagcgc cgctgacaag 2681
 aatgtcattc gccggcttta gtccaacaa agcgtgtct actaatccag atccgaaaac 2741
 agcgagccgc ccgttcgata aaaaccgtga tggctttgtc atgggggaag gtgcagggat 2801
 tatcgttctt gaagaacttg agcatgcc 2829


```

<;211>; 21
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;400>; 4
aaggaggca acgcgtttga c    21

```

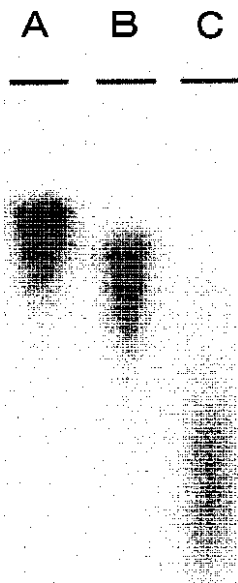
【図面の簡単な説明】

【図 1】 アガロース電気泳動終了後の 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 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欠損変異株の培養液から精製した γ -ポリグルタミン酸試料 (10 μ L) を、Bは γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ遺伝子欠損変異株の培養液から精製した γ -ポリグルタミン酸試料 (10 μ L) を、Cは野生型納豆菌の培養液から精製した γ -ポリグルタミン酸試料 (10 μ L) を、それぞれ表す。

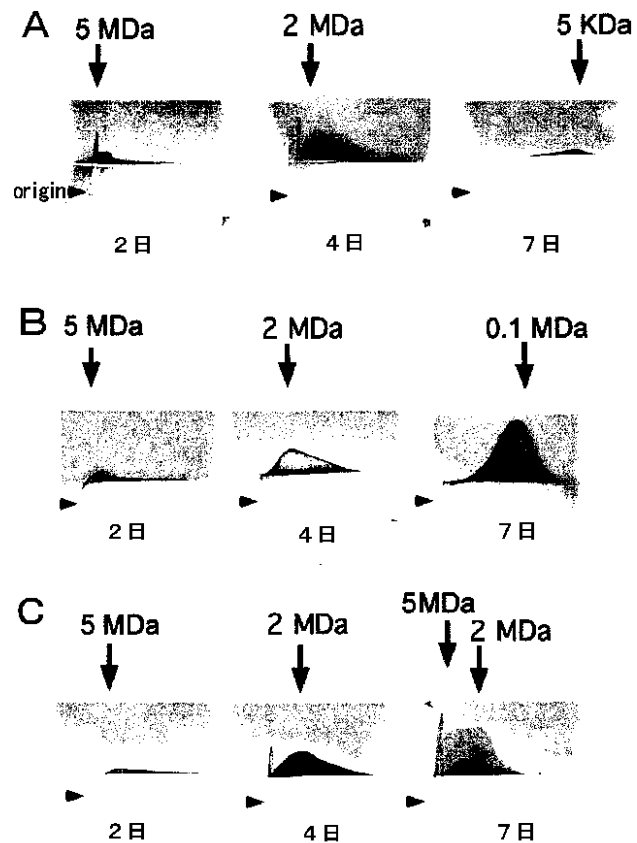
【図 2】 2 次元免疫電気泳動終了後の γ -ポリグルタミン酸の泳動像を示したものである。図中、Aは野生型納豆菌の培養物から得た γ -ポリグルタミン酸を、Bは γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ遺伝子欠損変異株の培養物から得た γ -ポリグルタミン酸を、Cは γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ遺伝子及び γ -ポリグルタミン酸ヒドロラーゼ遺伝子欠損変異株の培養物から得た γ -ポリグルタミン酸を、それぞれ表す。

【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。

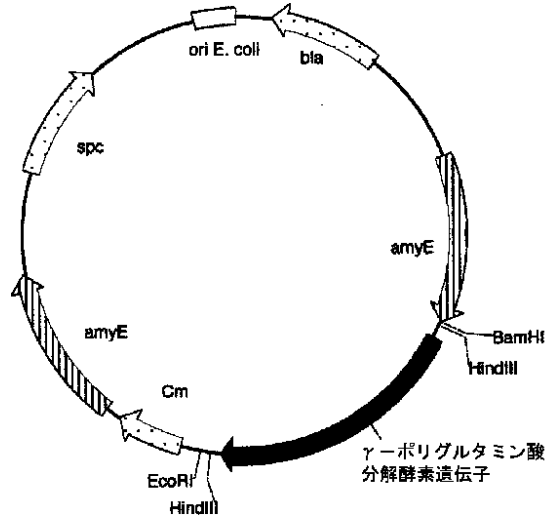
【図 1】



【図 2】



【図3】



フロントページの続き

(72)発明者 木村 啓太郎
茨城県つくば市竹園3丁目302-906
(72)発明者 伊藤 義文
茨城県つくば市並木3丁目14-18

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA05 BA80 CA04 DA07
EA04 FA02 FA20 GA11
4B064 AG01 CA02 CA19 CC24 DA01
DA10
4B065 AA19X AA19Y AB01 AC14
BA02 BA24 CA24 CA41 CA44