



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 202409063 A

(43) 公開日：中華民國 113 (2024) 年 03 月 01 日

(21) 申請案號：112123992

(22) 申請日：中華民國 112 (2023) 年 06 月 28 日

(51) Int. Cl. :

C07K14/195 (2006.01)

C12N15/63 (2006.01)

C12N15/64 (2006.01)

C12N15/31 (2006.01)

(30) 優先權：2022/06/30

日本

2022-106069

(71) 申請人：日商三井化學股份有限公司 (日本) MITSUI CHEMICALS, INC. (JP)

日本

(72) 發明人：望月大資 MOCHIZUKI, DAISUKE (JP) ; 德田淳子 TOKUDA, JUNKO (JP) ; 喜田

泰史 KIDA, YASUSHI (JP)

(74) 代理人：周良吉；周宜新

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：14 項 圖式數：0 共 87 頁

(54) 名稱

變異型脞水合酶、編碼該變異型脞水合酶之核酸、含有該核酸之載體及轉形體、該變異型脞水合酶之製造方法、及醯胺化合物之製造方法

(57) 摘要

本發明提供一種變異型脞水合酶，為具有和序列編號 1 為 90% 以上之序列同一性之 α 次單元、及和序列編號 2 為 90% 以上之序列同一性之 β 次單元之來自嗜熱假諾卡氏菌之脞水合酶，其中包含選自由 α 次單元之 N 末端起第 23 位、第 105 位、第 142 位、第 145 位、第 152 位、第 153 位、第 180 位及第 188 位、及 β 次單元之 N 末端起第 89 位、第 122 位、第 149 位、第 153 位、第 189 位、第 207 位、第 232 位、第 233 位及第 50 位構成之群組中之至少 1 個位置之胺基酸殘基為特定胺基酸殘基之取代。

【發明摘要】

【中文發明名稱】 變異型腈水合酶、編碼該變異型腈水合酶之核酸、含有該核酸之載體及轉形體、該變異型腈水合酶之製造方法、及醯胺化合物之製造方法

【英文發明名稱】 MUTANT NITRILE HYDRATASE, NUCLEIC ACID ENCODING THE MUTANT NITRILE HYDRATASE, EXPRESSION VECTOR AND TRANSFORMANT CONTAINING THE NUCLEIC ACID, PRODUCTION METHOD FOR MUTANT NITRILE HYDRATASE, AND PRODUCTION METHOD FOR AMIDE COMPOUND

【中文】

本發明提供一種變異型腈水合酶，為具有和序列編號1為90%以上之序列同一性之 α 次單元、及和序列編號2為90%以上之序列同一性之 β 次單元之來自嗜熱假諾卡氏菌之腈水合酶，其中包含選自由 α 次單元之N末端起第23位、第105位、第142位、第145位、第152位、第153位、第180位及第188位、及 β 次單元之N末端起第89位、第122位、第149位、第153位、第189位、第207位、第232位、第233位及第50位構成之群組中之至少1個位置之胺基酸殘基為特定胺基酸殘基之取代。

【指定代表圖】 無

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 變異型腈水合酶、編碼該變異型腈水合酶之核酸、含有該核酸之載體及轉形體、該變異型腈水合酶之製造方法、及醯胺化合物之製造方法

【英文發明名稱】 MUTANT NITRILE HYDRATASE, NUCLEIC ACID ENCODING THE MUTANT NITRILE HYDRATASE, EXPRESSION VECTOR AND TRANSFORMANT CONTAINING THE NUCLEIC ACID, PRODUCTION METHOD FOR MUTANT NITRILE HYDRATASE, AND PRODUCTION METHOD FOR AMIDE COMPOUND

【技術領域】

【0001】

本揭示係關於變異型腈水合酶、編碼該變異型腈水合酶之核酸、含有該核酸之載體及轉形體、該變異型腈水合酶之製造方法、及醯胺化合物之製造方法。

【先前技術】

【0002】

腈水合酶係具有將各種化合物之腈基利用水合而變換為醯胺基之腈水合活性的酵素，利用於利用酵素反應之工業化醯胺化合物之製造處理。

【0003】

已知作為係醯胺化合物之丙烯醯胺之製造原料使用之丙烯腈，可能含有各式各樣的雜質(例如：為副產物之丙烯醛等)。專利文獻1記載丙烯腈製造時通常會產生作為副產物之丙烯醛，其會形成不溶性聚合物作為副反應。

【0004】

專利文獻2中就作為丙烯腈中含有的雜質之一例，記載丙烯醛會抑制利用腈水合酶所為之丙烯醯胺之合成反應。專利文獻2記載藉由使用離子交換樹脂等使原料丙烯腈中之丙烯醛之濃度成為1ppm以下，能夠使由於丙烯醛引起之對於利用腈水合酶所為之催化作用之抑制不發生。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0005】

[專利文獻1]日本特開2012-139233號公報

[專利文獻2]日本特開2012-29695號公報

【發明內容】

(發明欲解決之課題)

【0006】

但是專利文獻2記載之方法，係藉由將原料丙烯腈中之丙烯醛濃度控制在1ppm以下以避免丙烯醛所致之腈水合酶活性抑制，並非是即使於雜質存在下仍能夠減小對於腈水合酶活性之抑制之方法。又，考量減少製造成本之觀點，尋求開發去除雜質之步驟、在反應系中能不需要捕捉雜質之添加劑等而能夠減少對於腈水合酶活性之抑制之技術。

【0007】

本揭示提供關於即使在雜質存在下仍能夠減小雜質對於使用腈水合酶之醯胺化合物生成反應之抑制之新穎變異型腈水合酶之技術。

(解決課題之方式)

【0008】

本揭示包括以下態樣。

<1>一種變異型脲水合酶，係具有和序列編號1表示之胺基酸序列為90%以上之序列同一性之 α 次單元及和序列編號2表示之胺基酸序列為90%以上之序列同一性之 β 次單元之脲水合酶，其中，

包含選自由下列(a)~(q)構成之群組中之至少1個胺基酸殘基之取代：

(a) α 次單元中，序列編號1之N末端起第23位對應之胺基酸殘基Ala取代為Gly，

(b) α 次單元中，序列編號1之N末端起第105位對應之胺基酸殘基Val取代為Met，

(c) α 次單元中，序列編號1之N末端起第142位對應之胺基酸殘基Leu取代為Cys，

(d) α 次單元中，序列編號1之N末端起第145位對應之胺基酸殘基Glu取代為Asp，

(e) α 次單元中，序列編號1之N末端起第152位對應之胺基酸殘基Pro取代為Gly，

(f) α 次單元中，序列編號1之N末端起第153位對應之胺基酸殘基Pro取代為Arg或Val，

(g) α 次單元中，序列編號1之N末端起第180位對應之胺基酸殘基Gly取代為Val，

(h) β 次單元中，序列編號2之N末端起第89位對應之胺基酸殘基Glu取代為Leu，

(i) β 次單元中，序列編號2之N末端起第122位對應之胺基酸殘基Ala取代為Ile、Leu或Thr，

(j) β 次單元中，序列編號2之N末端起第149位對應之胺基酸殘基Thr取代為Gln，

(k) β 次單元中，序列編號2之N末端起第153位對應之胺基酸殘基Lys取代為Val、Arg或Pro，

(l) β 次單元中，序列編號2之N末端起第189位對應之胺基酸殘基Cys取代為Ser，

(m) β 次單元中，序列編號2之N末端起第207位對應之胺基酸殘基Glu取代為Pro、Ser或Gly，

(n) β 次單元中，序列編號2之N末端起第232位對應之胺基酸殘基Ala取代為Trp、Ser、Pro、Phe、Ile、Arg、Cys或Gly，

(o) β 次單元中，序列編號2之N末端起第233位對應之胺基酸殘基Ala取代為Glu或Gln，

(p) α 次單元中，序列編號1之N末端起第188位對應之胺基酸殘基Thr取代為Lys，

(q) β 次單元中，序列編號2之N末端起第50位對應之胺基酸殘基Glu取代為Gly。

<2>如<1>之變異型脛水合酶，包含選自由前述(a)~前述(q)構成之群組中之至少2個胺基酸殘基取代。

<3>如<1>或<2>之變異型脛水合酶，包含選自由前述(i)、(g)、(j)、及(n)構成之群組中之至少1個胺基酸殘基取代。

<4>如<1>或<2>之變異型脛水合酶，包含選自由前述(i)、(g)、(l)、及(m)構成之群組中之至少1個胺基酸殘基取代。

<5>如<1>或<2>之變異型脛水合酶，包含選自由前述(g)、(p)、及(q)構成之群組中之至少1個胺基酸殘基取代。

<6>如<1>或<2>之變異型脞水合酶，其中，前述 α 次單元之胺基酸序列更包含選自由下列(A1)~(A6)構成之群組中之至少1個胺基酸殘基取代：

(A1) α 次單元中，序列編號1之N末端起第20位對應之胺基酸殘基Arg取代為Val，

(A2) α 次單元中，序列編號1之N末端起第141位對應之胺基酸殘基Gln取代為Arg，

(A3) α 次單元中，序列編號1之N末端起第185位對應之胺基酸殘基Glu取代為Ala，

(A4) α 次單元中，序列編號1之N末端起第187位對應之胺基酸殘基Ala取代為Arg，

(A5) α 次單元中，序列編號1之N末端起第200位對應之胺基酸殘基Pro取代為Ala，

(A6) α 次單元中，序列編號1之N末端起第204位對應之胺基酸殘基Val取代為Leu。

<7>如<1>或<2>之變異型脞水合酶，其中，前述 β 次單元之胺基酸序列更包含選自由下列(B1)~(B9)構成之群組中之至少1個胺基酸殘基取代：

(B1) β 次單元中，序列編號2之N末端起第40位對應之胺基酸殘基Thr取代為Ile，

(B2) β 次單元中，序列編號2之N末端起第42位對應之胺基酸殘基Arg取代為Pro，

(B3) β 次單元中，序列編號2之N末端起第76位對應之胺基酸殘基Thr取代為Cys，

(B4) β 次單元中，序列編號2之N末端起第83位對應之胺基酸殘基Thr取代為His，

(B5) β 次單元中，序列編號2之N末端起第88位對應之胺基酸殘基Leu取代為Arg、Pro或Ser，

(B6) β 次單元中，序列編號2之N末端起第146位對應之胺基酸殘基Arg取代為Gln或Thr，

(B7) β 次單元中，序列編號2之N末端起第160位對應之胺基酸殘基Arg取代為Gln或Ile，

(B8) β 次單元中，序列編號2之N末端起第108位對應之胺基酸殘基Glu取代為Arg，

(B9) β 次單元中，序列編號2之N末端起第176位對應之胺基酸殘基Tyr取代為Cys。

<8>一種核酸，編碼如<1>~<7>中任一項之變異型脛水合酶。

<9>一種載體，含有如<8>之核酸。

<10>如<9>之載體，係表現載體。

<11>一種轉形體，含有如<10>之表現載體。

<12>一種變異型脛水合酶之製造方法，包括下列步驟：

在培養基中培養如<11>之轉形體；及

從培養的轉形體及培養基中之至少一者回收如<1>~<7>中任一項之變異型脛水合酶。

<13>一種變異型脛水合酶，係利用如<12>之變異型脛水合酶之製造方法獲得。

<14>一種醯胺化合物之製造方法，包括使如<1>~<7>中任一項之變異型脛水合酶接觸脛化合物之步驟。

(發明之效果)

【0009】

依本揭示，可提供即使在雜質存在下仍可減小雜質對於使用脛水合酶之醯胺化合物生成反應所致之抑制之與新穎變異型脛水合酶相關的技術。

【實施方式】

【0010】

以下針對本揭示之實施形態進行說明。該等說明及實施例係對於實施形態加以例示，並非限制實施形態之範圍。

【0011】

本揭示分階段記載之數值範圍中，以一個數值範圍記載之上限值或下限值，也可替換成其他分階段記載之數值範圍之上限值或下限值。又，本揭示中記載之數值範圍中，一數值範圍之上限值或下限值也可替換成實施例揭示之值。

【0012】

本揭示中，各成分也可含有多種相應的物質。

本揭示中，當提及組成物中之各成分之量時，於組成物中有多種相應各成分之物質存在時，若無特別指明，係指組成物中存在之該多種物質之合計量。

【0013】

本揭示中，「步驟」之用語不僅涵蓋獨立的步驟，當和其他步驟無法明確區別時，只要可達成該步驟所期待的目的，則涵蓋在本用語中。

本揭示中使用「~」代表之數值範圍，代表包含「~」前後記載之數值作為最小值及最大值之範圍。

本揭示中，組成物中之各成分之量，當組成物中之各成分相應之物質有多種存在時，若無特別指明，係指組成物中存在之該多種物質之合計量。

【0014】

本揭示中，「酵素活性」係指將脛基轉換為醯胺基之脛水合活性。

本揭示中，核苷酸序列之說明，有時會有即使攜帶該核苷酸序列之核酸鏈係形成雙股但是仍著眼在其中一股上之序列的情形，但雙股中之另一股，如此的序列說明應該適用於它們的互補序列。

【0015】

本揭示中，三字母符號，若無特別指明，係代表胺基酸殘基。例如：「Ile」代表異白胺酸殘基。

【0016】**<變異型脞水合酶>**

本揭示提供一種變異型脞水合酶，係具有和序列編號1表示之胺基酸序列為90%以上之序列同一性之 α 次單元、及和序列編號2表示之胺基酸序列為90%以上之序列同一性之 β 次單元之脞水合酶，其中，包含選自由下列(a)~(q)構成之群組中之至少1個胺基酸殘基之取代：

(a) α 次單元中，序列編號1之N末端起第23位對應之胺基酸殘基Ala取代為Gly，

(b) α 次單元中，序列編號1之N末端起第105位對應之胺基酸殘基Val取代為Met，

(c) α 次單元中，序列編號1之N末端起第142位對應之胺基酸殘基Leu取代為Cys，

(d) α 次單元中，序列編號1之N末端起第145位對應之胺基酸殘基Glu取代為Asp，

(e) α 次單元中，序列編號1之N末端起第152位對應之胺基酸殘基Pro取代為Gly，

(f) α 次單元中，序列編號1之N末端起第153位對應之胺基酸殘基Pro取代為Arg或Val，

(g) α 次單元中，序列編號1之N末端起第180位對應之胺基酸殘基Gly取代為Val，

(h) β 次單元中，序列編號2之N末端起第89位對應之胺基酸殘基Glu取代為Leu，

(i) β 次單元中，序列編號2之N末端起第122位對應之胺基酸殘基Ala取代為Ile、Leu或Thr，

(j) β 次單元中，序列編號2之N末端起第149位對應之胺基酸殘基Thr取代為Gln，

(k) β 次單元中，序列編號2之N末端起第153位對應之胺基酸殘基Lys取代為Val、Arg或Pro，

(l) β 次單元中，序列編號2之N末端起第189位對應之胺基酸殘基Cys取代為Ser，

(m) β 次單元中，序列編號2之N末端起第207位對應之胺基酸殘基Glu取代為Pro、Ser或Gly，

(n) β 次單元中，序列編號2之N末端起第232位對應之胺基酸殘基Ala取代為Trp、Ser、Pro、Phe、Ile、Arg、Cys或Gly，

(o) β 次單元中，序列編號2之N末端起第233位對應之胺基酸殘基Ala取代為Glu或Gln，

(p) α 次單元中，序列編號1之N末端起第188位對應之胺基酸殘基Thr取代為Lys，

(q) β 次單元中，序列編號2之N末端起第50位對應之胺基酸殘基Glu取代為Gly。

【0017】

含有選自由上述(a)~(q)構成之群組中之至少1個胺基酸殘基之取代之變異型脞水合酶，迄今尚無人報告，係新穎變異體。

【0018】

本揭示之變異型脞水合酶，和來自野生型嗜熱假諾卡氏菌(*Pseudonocardia thermophila*)之脞水合酶及習知的變異型脞水合酶不同，即使在雜質存在下、雜質(例如：丙烯醛等)之存在下，仍能減小由於雜質所致對於使用脞水合酶之醯胺化合物生成反應的抑制，對於由脞化合物合成醯胺化合物之反應呈現優良的酵素活性。

【0019】

再者，本揭示之變異型脞水合酶具有之減少對於前述雜質所致反應抑制之作用，當雜質含量為高濃度(例如：1000ppm以上)時尤其顯著。所以依本揭示之變異型脞水合酶，在利用了脞水合酶之工業化醯胺化合物之製造處理中，即使使用未充分精製之原料，仍能夠使合成醯胺化合物之反應充分進行。如此，依本揭示之變異型脞水合酶，相較於使用習知之酵素之情形，能夠使工業化醯胺化合物之製造效率飛躍性地提升。

【0020】

本揭示之變異型脞水合酶，具有和序列編號1表示之胺基酸序列具90%以上之序列同一性之 α 次單元、及和序列編號2表示之胺基酸序列具90%以上之序列同一性之 β 次單元，且含有選自由前述(a)~(q)構成之群組中之至少1個胺基酸殘基之取代。

【0021】

序列編號1表示之胺基酸序列，係來自野生型嗜熱假諾卡氏菌之脞水合酶之 α 次單元之胺基酸序列。

序列編號2表示之胺基酸序列，係來自野生型嗜熱假諾卡氏菌之脛水合酶之 β 次單元之胺基酸序列。

【0022】

和序列編號1表示之胺基酸序列具90%以上之序列同一性之 α 次單元，係指和來自野生型嗜熱假諾卡氏菌之脛水合酶擁有之 α 次單元(也稱為野生型 α 次單元)比較時，和野生型 α 次單元之胺基酸序列具有90%以上一致的胺基酸序列之 α 次單元。

同樣，和序列編號2表示之胺基酸序列具有90%以上之序列同一性之 β 次單元，係指和來自野生型嗜熱假諾卡氏菌之脛水合酶擁有之 β 次單元(也稱為野生型 β 次單元)比較時，和野生型 β 次單元之胺基酸序列具有90%以上一致之胺基酸序列之 β 次單元。

【0023】

變異型脛水合酶，具有和序列編號1表示之胺基酸序列具90%以上之序列同一性之 α 次單元，且也可具有和序列編號1表示之胺基酸序列具95%以上之序列同一性之 α 次單元，也可具有和序列編號1表示之胺基酸序列具98%以上之序列同一性之 α 次單元。

變異型脛水合酶，具有和序列編號2表示之胺基酸序列具90%以上之序列同一性之 β 次單元，也可具有和序列編號1表示之胺基酸序列具95%以上之序列同一性之 β 次單元，也可具有和序列編號1表示之胺基酸序列具98%以上之序列同一性之 β 次單元。

【0024】

變異型脛水合酶，其基本結構單元是 α 次單元與 β 次單元締合成的二聚體，此二聚體更進一步締合而形成4量體。為 α 次單元之N末端起第111位之胺基酸殘基之半胱胺酸殘基經轉譯後修飾成半胱胺酸亞磺酸(Cys-SOOH)，N末端起第113

位之胺基酸殘基之半胱胺酸殘基經轉譯後修飾成半胱胺酸次磺酸(Cys-SOH)，經由此修飾胺基酸殘基， α 次單元之多肽鏈與鈷原子鍵結，並形成活性中心。

【0025】

(變異位置)

本揭示之變異型脞水合酶，含有選自由上述(a)~(q)構成之群組中之至少1個胺基酸殘基之取代。

【0026】

本揭示之變異型脞水合酶，只要至少含有1個選自由前述(a)~(q)構成之群組中之胺基酸殘基取代即可，將多種組合而含有亦可。

本揭示之變異型脞水合酶，在減小由於雜質所致對於使用脞水合酶之醯胺化合物生成反應之抑制之範圍內，也可更含有由前述(a)~(q)構成之群組以外之胺基酸殘基之取代。

【0027】

本揭示之變異型脞水合酶，考量更減小由於雜質所致之對於使用脞水合酶之醯胺化合物生成反應之抑制之觀點，宜含有選自由前述(a)~前述(q)構成之群組中之至少2個胺基酸殘基取代較佳。

【0028】

本揭示之變異型脞水合酶，考量更減小由於雜質所致之對於使用脞水合酶之醯胺化合物生成反應之抑制之觀點，含有前述(i)之胺基酸殘基取代更佳。

【0029】

本揭示之變異型脞水合酶，考量更減小由於雜質所致之對於使用脞水合酶之醯胺化合物生成反應之抑制之觀點，也可含有選自由前述(a)~前述(q)構成之群組中之3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、

10個以上、11個以上、12個以上、13個以上、14個以上、15個以上、16個以上、或17個胺基酸殘基取代。

本揭示之變異型脞水合酶，也可含有選自由前述(a)~前述(q)構成之群組中之16個以下、15個以下、14個以下、13個以下、12個以下、11個以下、10個以下、9個以下、8個以下、7個以下、6個以下、5個以下、4個以下、3個以下、或2個以下之胺基酸殘基取代。

【0030】

本揭示之變異型脞水合酶，組合含有選自由前述(a)~前述(q)構成之群組中之2個胺基酸殘基取代時，前述2個胺基酸殘基取代之組合無特殊限制，例如：考量更減小由於雜質所致之對於使用脞水合酶之醯胺化合物生成反應之抑制之觀點，也可含有下列組合。又，下列組合之例示中，針對由前述(a)~前述(q)構成之群組織胺基酸殘基取代，簡化而只記載變異位置。例如：上述(j) β 149與(n) β 232之組合，係指(j) β 次單元中，序列編號2之N末端起第149位對應之胺基酸殘基Thr取代為Gln、及(n) β 次單元中，序列編號2之N末端起第232位對應之胺基酸殘基Ala取代為Trp、Ser、Pro、Phe、Ile、Arg、Cys或Gly之組合。如前述(n)，變異後之胺基酸殘基之候選基有多個時，下列組合可為前述候選基之任一者。後述3種以上之胺基酸殘基取代組合含有時之組合之例示記載亦同。

【0031】

- (j) β 149與(n) β 232之組合、
- (i) β 122與(g) α 180之組合、
- (l) β 189與(m) β 207之組合、
- (o) β 233與(h) β 89之組合、
- (b) α 105與(c) α 142之組合、
- (c) α 142與(g) α 180之組合、

- (i) β 122與(n) β 232之組合、
- (i) β 122與(j) β 149之組合、
- (q) β 50與(h) β 89之組合、
- (p) α 188與(l) β 189之組合、
- (p) α 188與(q) β 50之組合。

【0032】

本揭示之變異型脛水合酶，當組合含有由前述(a)~前述(q)構成之群組中之3個胺基酸殘基取代時，前述3個胺基酸殘基取代之組合無特殊限制，例如：考量更減小由於雜質所致之對於使用脛水合酶之醯胺化合物生成反應之抑制之觀點，也可含有下列組合。又，下列組合之例示，針對由前述(a)~前述(q)構成之群組織胺基酸殘基取代，係簡化而只記載變異位置。

- (i) β 122與(n) β 232與(g) α 180之組合、
- (i) β 122與(j) β 149與(n) β 232之組合、
- (m) β 207與(b) α 105與(g) α 180之組合、
- (m) β 207與(l) β 189與(g) α 180之組合、
- (m) β 207與(n) β 232與(g) α 180之組合、
- (g) α 180與(p) α 188與(q) β 50之組合、
- (i) β 122與(j) β 149與(m) β 207之組合、
- (i) β 122與(l) β 189與(m) β 207之組合、
- (q) β 50與(a) α 23與(b) α 105之組合。

【0033】

本揭示之變異型脛水合酶，當組合含有由前述(a)~前述(q)構成之群組中之4個胺基酸殘基取代時，前述3個胺基酸殘基取代之組合無特殊限制，例如：考量更減小由於雜質所致之對於使用脛水合酶之醯胺化合物生成反應之抑制之觀

點，也可含有下列組合。又，下列組合之例示，針對由前述(a)~前述(q)構成之群組中之胺基酸殘基取代，係簡化而只記載變異位置。

- (i) β 122與(j) β 149與(n) β 232與(g) α 180之組合、
- (i) β 122與(m) β 207與(n) β 232與(g) α 180之組合、
- (i) β 122與(l) β 189與(m) β 207與(g) α 180之組合、
- (p) α 188與(q) β 50與(a) α 23與(l) β 189之組合、
- (p) α 188與(q) β 50與(g) α 180與(o) β 233之組合、
- (a) α 23與(d) α 145與(e) α 152與(o) β 233之組合、
- (b) α 105與(f) α 153與(h) β 89與(n) β 232之組合、
- (q) β 50與(d) α 145與(e) α 152與(o) β 233之組合。

【0034】

其他，當然也能將由前述(a)~前述(q)構成之群組中之5個以上之胺基酸殘基取代予以組合取代。

【0035】

本揭示之變異型脞水合酶若含有選自由前述(i)、(g)、(l)及(m)構成之群組中之至少1個胺基酸殘基取代，則不只有前述抑制由於雜質所致之反應抑制之效果，尚有脞水合酶之熱安定性提高的傾向。習知之脞水合酶，在比室溫(20°C)更高之溫度，會有觸媒活性降低的傾向。所以，使用室溫下之溶解性低之原料於反應時，會有獲得之醃胺化合物之產量少、或製造時需冷卻裝置，考量製造成本之觀點，尋求改善。

對此，具有上述構成之本揭示之變異型脞水合酶，例如即使在比室溫(例如：20°C)高之溫度(例如：30°C)，仍比習知之脞水合酶，熱安定性高、亦維持觸媒活性為高。藉此，具有上述構成之本揭示之變異型脞水合酶，即使使用於室溫下之溶解性低之原料於反應時仍能夠使反應系之溫度上昇，故比起習知脞水合

酶，獲得之醯胺化合物之產量容易提高，又，製造時不需要冷卻裝置，考量製造成本之觀點，可獲得更優良的附帶效果。

【0036】

本揭示之變異型脛水合酶，考量更減小由於雜質所致之對於使用脛水合酶之醯胺化合物生成反應之抑制之觀點， α 次單元之胺基酸序列也可更含有選自由下列(A1)~(A6)構成之群組中之至少1個胺基酸殘基取代：

(A1) α 次單元中，序列編號1之N末端起第20位對應之胺基酸殘基Arg取代為Val、

(A2) α 次單元中，序列編號1之N末端起第141位對應之胺基酸殘基Gln取代為Arg、

(A3) α 次單元中，序列編號1之N末端起第185位對應之胺基酸殘基Glu取代為Ala、

(A4) α 次單元中，序列編號1之N末端起第187位對應之胺基酸殘基Ala取代為Arg、

(A5) α 次單元中，序列編號1之N末端起第200位對應之胺基酸殘基Pro取代為Ala、

(A6) α 次單元中，序列編號1之N末端起第204位對應之胺基酸殘基Val取代為Leu。

【0037】

本揭示之變異型脛水合酶，考量更減小由於雜質所致之對於使用脛水合酶之醯胺化合物生成反應之抑制之觀點， β 次單元之胺基酸序列也可更含有選自由下列(B1)~(B9)構成之群組中之至少1個胺基酸殘基取代：

(B1) β 次單元中，序列編號2之N末端起第40位對應之胺基酸殘基Thr取代為Ile、

(B2) β 次單元中，序列編號2之N末端起第42位對應之胺基酸殘基Arg取代為Pro，

(B3) β 次單元中，序列編號2之N末端起第76位對應之胺基酸殘基Thr取代為Cys，

(B4) β 次單元中，序列編號2之N末端起第83位對應之胺基酸殘基Thr取代為His，

(B5) β 次單元中，序列編號2之N末端起第88位對應之胺基酸殘基Leu取代為Arg、Pro或Ser，

(B6) β 次單元中，序列編號2之N末端起第146位對應之胺基酸殘基Arg取代為Gln或Thr，

(B7) β 次單元中，序列編號2之N末端起第160位對應之胺基酸殘基Arg取代為Gln或Ile，

(B8) β 次單元中，序列編號2之N末端起第108位對應之胺基酸殘基Glu取代為Arg，

(B9) β 次單元中，序列編號2之N末端起第176位對應之胺基酸殘基Tyr取代為Cys。

【0038】

於可發揮本揭示之效果之範圍內，變異型脞水合酶也可含有由前述(a)~(q)構成之胺基酸殘基取代基群、由前述(A1)~(A6)構成之胺基酸殘基取代群、及由前述(B1)~(B9)構成之胺基酸殘基取代群以外之取代(以下稱為「其他胺基酸殘基取代」)。

【0039】

變異型脞水合酶中，由前述(a)~(q)構成之胺基酸殘基取代基群、由前述(A1)~(A6)構成之胺基酸殘基取代群、及由前述(B1)~(B9)構成之胺基酸殘基取代

群選出之取代之合計數，只要為1以上即可，無特殊限制，例如可為1~20、1~15、1~10、1~8、1~7、1~6、1~5、1~4、1~3、1~2、或1中之任一者。

【0040】

本揭示之變異型脞水合酶，例如：考量更減小由於雜質所致之對於使用脞水合酶之醯胺化合物生成反應之抑制之觀點，也可含有選自由前述(i)、(g)、(j)、及(n)構成之群組中之至少1個胺基酸殘基取代，也可含有前述(i)、(j)及(n)之胺基酸殘基取代，也可含有前述(i)、(g)、(j)及(n)之全部胺基酸殘基取代。

【0041】

就一實施形態而言，例如：本揭示之變異型脞水合酶，考量更減小由於雜質所致之對於使用脞水合酶之醯胺化合物生成反應之抑制之觀點，及熱安定性優異之觀點，也可含有選自由前述(i)、(g)、(l)、及(m)構成之群組中之至少1個胺基酸殘基取代，也可含有前述(i)、(l)及(m)之胺基酸殘基取代，也可含有前述(i)、(g)、(l)及(m)之全部胺基酸殘基取代。

【0042】

就一實施形態而言，例如：本揭示之變異型脞水合酶，考量更減小由於雜質所致之對於使用脞水合酶之醯胺化合物生成反應之抑制之觀點，也可含有選自由前述(g)、(p)、及(q)構成之群組中之至少1個胺基酸殘基取代，也可含有前述(p)及(q)之胺基酸殘基取代，也可含有前述(g)、(p)及(q)之全部胺基酸殘基取代。

【0043】

從由前述(a)~前述(q)構成之群組、由前述(A1)~(A6)構成之群組、及由前述(B1)~(B9)構成之群組選出之2個胺基酸殘基取代之組合之例示如下所示，但本揭示不限於此。又，表中，變異位置之欄之數字，代表從該次單元中之胺基酸序列N末端側起算之位置。

【0044】

[表1-1]

位置	氨基酸	位置	氨基酸	位置	氨基酸
2-1	6122	Ala	Ile		
2-2	6232	Ala	Trp		
2-3	6122	Ala	Ile		
2-4	6163	Lys	Arg		
2-5	6207	Glu	Pro		
2-6	6180	Gly	Val		
2-7	6180	Gly	Val		
2-8	6122	Ala	Ile		
2-9	6149	Thr	Gln		
2-10	6149	Thr	Gln		
2-11	6232	Ala	Trp		
2-12	6189	Cys	Ser		
2-13	6207	Glu	Pro		
2-14	6122	Ala	Ile		
2-15	6189	Cys	Ser		
2-16	6122	Ala	Ile		
2-17	6207	Glu	Pro		
2-18	6180	Gly	Val		
2-19	6149	Thr	Gln		
2-20	6166	Thr	Lys		
2-21	650	Glu	Gly		
2-22	628	Ala	Gly		
2-23	6142	Leu	Cys		
2-24	6145	Glu	Asp		
2-25	6152	Pro	Gly		
2-26	669	Glu	Leu		
2-27	6122	Ala	Leu		
2-28	6163	Lys	Val		
2-29	6233	Ala	Glu		

(0045)

[表1-2]

2-16	$\alpha 28$	Ala	Gly
	$\alpha 106$	Val	Met
2-17	$\alpha 188$	Thr	Lys
	$\alpha 186$	Glu	Ala
2-18	$\beta 50$	Glu	Gly
	$\beta 76$	Thr	Cys
2-19	$\alpha 188$	Thr	Lys
	$\alpha 20$	Arg	Val
2-20	$\beta 286$	Ala	Glu
	$\alpha 28$	Ala	Gly
2-21	$\beta 168$	Lys	Val
	$\alpha 106$	Val	Met
2-22	$\alpha 162$	Pro	Gly
	$\alpha 111$	Gln	Arg
2-23	$\alpha 168$	Pro	Arg
	$\alpha 116$	Glu	Asp
2-24	$\beta 122$	Ala	Ile
	$\alpha 188$	Thr	Lys
2-25	$\beta 282$	Ala	Trp
	$\alpha 200$	Pro	Ala
2-26	$\alpha 28$	Ala	Gly
	$\alpha 204$	Val	Ileu
2-27	$\alpha 142$	Ileu	Cys
	$\beta 40$	Thr	Ile
2-28	$\alpha 180$	Gly	Val
	$\beta 42$	Arg	Pro
2-29	$\alpha 180$	Gly	Val
	$\beta 60$	Glu	Gly
2-30	$\beta 282$	Ala	Trp
	$\beta 160$	Arg	Gln

(0046)

從由前述(a)~前述(c)構成之群組、由前述(A1)~(A6)構成之群組、及由前述(B1)~(B9)構成之群組選出之3個胺基酸殘基取代之組合之例示如下所示，但本揭示不限定於此。又，下列表中，變異處之欄之數字，代表從該次群組中之胺基酸序列N末端側起算之位置。

(0047)

[表2-1]

3-1	B122	Ala	Ileu
	B232	Ala	Pro
	G180	Gly	Val
3-2	B122	Ala	Ile
	B149	Thr	Gln
	B232	Ala	Trp
3-3	B207	Glu	Gly
	G105	Val	Met
	G180	Gly	Val
3-4	B207	Gln	Gly
	B189	Cys	Ser
	G180	Gly	Val
3-5	B207	Glu	Gly
	B232	Ala	Gly
	G180	Gly	Val
3-6	B207	Glu	Gly
	B232	Ala	Arg
	G180	Gly	Val
3-7	B122	Ala	Ile
	B149	Thr	Gln
	B207	Glu	Gly
3-8	B122	Ala	Ile
	B207	Glu	Gly
	B232	Ala	Arg
3-9	B122	Ala	Ile
	B189	Cys	Ser
	B207	Glu	Gly
3-10	G28	Ala	Gly
	G180	Gly	Val
	B122	Ala	Ile

(0048)

[表2.2]

編號	變異位置	變異前	變異後
15-111	15-111	Met	Met
	15-112	Leu	Cys
	15-113	Gly	Met
15-114	15-114	Trp	Val
	15-115	Leu	Val
	15-116	Val	Val
15-117	15-117	Met	Met
	15-118	Met	Met
	15-119	Met	Met
	15-120	Met	Met
	15-121	Met	Met
	15-122	Met	Met
	15-123	Met	Met
	15-124	Met	Met
	15-125	Met	Met
	15-126	Met	Met
	15-127	Met	Met
	15-128	Met	Met
	15-129	Met	Met
	15-130	Met	Met
	15-131	Met	Met
	15-132	Met	Met
	15-133	Met	Met
	15-134	Met	Met
	15-135	Met	Met
	15-136	Met	Met
	15-137	Met	Met
	15-138	Met	Met
	15-139	Met	Met
	15-140	Met	Met
	15-141	Met	Met
	15-142	Met	Met
	15-143	Met	Met
	15-144	Met	Met
	15-145	Met	Met
	15-146	Met	Met
	15-147	Met	Met
	15-148	Met	Met
	15-149	Met	Met
	15-150	Met	Met
	15-151	Met	Met
	15-152	Met	Met
	15-153	Met	Met
	15-154	Met	Met
	15-155	Met	Met
	15-156	Met	Met
	15-157	Met	Met
	15-158	Met	Met
	15-159	Met	Met
	15-160	Met	Met
	15-161	Met	Met
	15-162	Met	Met
	15-163	Met	Met
	15-164	Met	Met
	15-165	Met	Met
	15-166	Met	Met
	15-167	Met	Met
	15-168	Met	Met
	15-169	Met	Met
	15-170	Met	Met
	15-171	Met	Met
	15-172	Met	Met
	15-173	Met	Met
	15-174	Met	Met
	15-175	Met	Met
	15-176	Met	Met
	15-177	Met	Met
	15-178	Met	Met
	15-179	Met	Met
	15-180	Met	Met
	15-181	Met	Met
	15-182	Met	Met
	15-183	Met	Met
	15-184	Met	Met
	15-185	Met	Met
	15-186	Met	Met
	15-187	Met	Met
	15-188	Met	Met
	15-189	Met	Met
	15-190	Met	Met
	15-191	Met	Met
	15-192	Met	Met
	15-193	Met	Met
	15-194	Met	Met
	15-195	Met	Met
	15-196	Met	Met
	15-197	Met	Met
	15-198	Met	Met
	15-199	Met	Met
	15-200	Met	Met
	15-201	Met	Met
	15-202	Met	Met
	15-203	Met	Met
	15-204	Met	Met
	15-205	Met	Met
	15-206	Met	Met
	15-207	Met	Met
	15-208	Met	Met
	15-209	Met	Met
	15-210	Met	Met
	15-211	Met	Met
	15-212	Met	Met
	15-213	Met	Met
	15-214	Met	Met
	15-215	Met	Met
	15-216	Met	Met
	15-217	Met	Met
	15-218	Met	Met
	15-219	Met	Met
	15-220	Met	Met
	15-221	Met	Met
	15-222	Met	Met
	15-223	Met	Met
	15-224	Met	Met
	15-225	Met	Met
	15-226	Met	Met
	15-227	Met	Met
	15-228	Met	Met
	15-229	Met	Met
	15-230	Met	Met
	15-231	Met	Met
	15-232	Met	Met
	15-233	Met	Met
	15-234	Met	Met
	15-235	Met	Met
	15-236	Met	Met
	15-237	Met	Met
	15-238	Met	Met
	15-239	Met	Met
	15-240	Met	Met
	15-241	Met	Met
	15-242	Met	Met
	15-243	Met	Met
	15-244	Met	Met
	15-245	Met	Met
	15-246	Met	Met
	15-247	Met	Met
	15-248	Met	Met
	15-249	Met	Met
	15-250	Met	Met
	15-251	Met	Met
	15-252	Met	Met
	15-253	Met	Met
	15-254	Met	Met
	15-255	Met	Met
	15-256	Met	Met
	15-257	Met	Met
	15-258	Met	Met
	15-259	Met	Met
	15-260	Met	Met
	15-261	Met	Met
	15-262	Met	Met
	15-263	Met	Met
	15-264	Met	Met
	15-265	Met	Met
	15-266	Met	Met
	15-267	Met	Met
	15-268	Met	Met
	15-269	Met	Met
	15-270	Met	Met
	15-271	Met	Met
	15-272	Met	Met
	15-273	Met	Met
	15-274	Met	Met
	15-275	Met	Met
	15-276	Met	Met
	15-277	Met	Met
	15-278	Met	Met
	15-279	Met	Met
	15-280	Met	Met
	15-281	Met	Met
	15-282	Met	Met
	15-283	Met	Met
	15-284	Met	Met
	15-285	Met	Met
	15-286	Met	Met
	15-287	Met	Met
	15-288	Met	Met
	15-289	Met	Met
	15-290	Met	Met
	15-291	Met	Met
	15-292	Met	Met
	15-293	Met	Met
	15-294	Met	Met
	15-295	Met	Met
	15-296	Met	Met
	15-297	Met	Met
	15-298	Met	Met
	15-299	Met	Met
	15-300	Met	Met

(0049)

從由前述(a)~前述(c)構成之群組、由前述(A1)~(A6)構成之群組、及由前述(B1)~(B9)構成之群組選出之4個胺基酸殘基取代之組合之例示如下所示，但本揭示不限定於此。又，下列表中，變異處之欄之數字，代表從該次變異中之胺基酸序列N末端側起算之位置。

(0050)

[表3]

編號	變異位置	變異前	變異後
4-1	WT19	Ala	Leu
	WT19	Thr	Gln
	WT19	Ala	Cys
4-2	WT19	Gly	Val
	WT19	Ala	His
	WT19	Glu	Gln
	WT19	Ala	Trp
4-3	WT19	Gly	Val
	WT19	Ala	His
	WT19	Cys	Ser
4-4	WT19	Glu	Gly
	WT19	Gly	Val
	WT19	Thr	Leu
4-5	WT19	Glu	Gly
	WT19	Ala	Gly
	WT19	Cys	Ser
4-6	WT19	Thr	His
	WT19	Glu	Gly
	WT19	Gly	Val
4-7	WT19	Ala	Gln
	WT19	Val	Met
	WT19	Ile	Phe
4-8	WT19	Gly	Val
	WT19	Glu	Ile
	WT19	Ala	Gln
4-9	WT19	Ala	Gln
	WT19	Thr	Gln
	WT19	Ala	Gln
4-10	WT19	Pro	Gly
	WT19	Pro	Arg
	WT19	Glu	Leu
4-11	WT19	Ile	Val
	WT19	Ala	Gln
	WT19	Val	Met
4-12	WT19	Glu	Gly
	WT19	Arg	Gln
	WT19	Ile	Arg
4-13	WT19	Pro	Arg
	WT19	Pro	Ala
	WT19	Arg	Pro
4-14	WT19	Glu	Leu
	WT19	Thr	Cys
	WT19	Leu	Arg
4-15	WT19	Arg	Gln
	WT19	Arg	Gln
	WT19	Arg	Gln

[(0051)]

從由前述(a)~前述(c)構成之群組、由前述(A1)~(A6)構成之群組、及由前述(B1)~(B9)構成之群組選出之5個胺基酸殘基取代之組合之例示如下所示，但本揭示不限定於此。又，下列表中，變異處之欄之數字，代表從該次單元中之胺基酸序列N末端側起算之位置。

[(0052)]

[表4]

變異處	變異處	變異處	變異處
β1	β122	Ala	Ile
	β189	Cys	Ser
	β207	Glu	Gly
	β232	Ala	Trp
	α180	Gly	Val
β2	β122	Ala	Ile
	β176	Tyr	Cys
	β189	Cys	Ser
	β207	Glu	Gly
	α180	Gly	Val
β3	α188	Thr	Lys
	β60	Glu	Gly
	α180	Gly	Val
	β146	Arg	Gln
	β160	Arg	Gln
β4	α23	Ala	Gly
	α180	Gly	Val
	β88	Thr	His
	β108	Glu	Arg
	β176	Tyr	Cys

[(0053)]

[脲水合酶]

本揭示之變異型脲水合酶，若為具有和序列編號1表示之胺基酸序列為90%以上之序列同一性之α次單元、及和序列編號2表示之胺基酸序列為90%以上之序列同一性之β次單元，且含有從由前述(a)~(c)構成之群組中選出之至少1個胺基酸殘基之取代即可，不限定脲水合酶之來源。

第24頁，共49頁(發明說明書)

脞水合酶之來源，可為例如：來自野生型嗜熱假諾卡氏菌之脞水合酶，也可為對於來自野生型嗜熱假諾卡氏菌之脞水合酶施加了改造的改造脞水合酶。

【0054】

(改造脞水合酶)

改造脞水合酶，也涵蓋對於來自野生型嗜熱假諾卡氏菌之脞水合酶施加了選自由下列(i)~(v)構成之群組中之1個以上之改造的改造脞水合酶：

(i) 1個以上之胺基酸殘基取代為其他胺基酸殘基，

(ii) 前述(a)~(q)之胺基酸殘基之取代以外之1個以上之胺基酸殘基之缺損、

(iii) 胺基酸殘基之插入、

(iv) 對於 α 次單元之胺基酸序列N末端及C末端中之一者或兩者附加胺基酸殘基、

(v) 對於 β 次單元之胺基酸序列N末端及C末端中之一者或兩者附加胺基酸殘基。

【0055】

改造脞水合酶之 α 次單元中，被取代之胺基酸殘基之數目，可為例如：1~20，或1~15，或1~10，或1~8，或1~7，1~6，或1~5，或1~4，或1~3，或1~2，或1。被取代之胺基酸殘基之數目也可為0。

改造脞水合酶之 β 次單元中，被取代之胺基酸殘基之數目，可為例如：1~20，或1~15，或1~10，或1~8，或1~7，或1~6，或1~5，或1~4，或1~3，或1~2，或1。被取代之胺基酸殘基之數目也可為0。

【0056】

改造脞水合酶之 α 次單元中，缺失之胺基酸殘基之數目，可為例如：1~10，或1~7，或1~4，或1~2，或1。缺失的胺基酸殘基的數目也可為0。

改造脗水合酶之 β 次單元中，缺失之胺基酸殘基之數目可為例如：1~10，或1~7，或1~4，或1~2，或1。缺失之胺基酸殘基的數目也可為0。

【0057】

改造脗水合酶之 α 次單元中，插入之胺基酸殘基之數目可為例如：1~10，或1~7，或1~4，或1~2，或1。插入之胺基酸殘基的數目也可為0。

改造脗水合酶之 β 次單元中，插入之胺基酸殘基之數目可為例如：1~10，或1~7，或1~4，或1~2，或1。插入之胺基酸殘基的數目也可為0。

【0058】

改造脗水合酶之 α 次單元中，取代、缺失或插入之胺基酸殘基之總數，例如：1~20，或1~14，或1~8，或1~4，或1~2，或1。有末端附加時等，取代、缺失或插入之胺基酸殘基之總數也可為0。

改造脗水合酶之 β 次單元中，取代、缺失或插入之胺基酸殘基之總數，例如：1~20，或1~14，或1~8，或1~4，或1~2，或1。有末端附加時等，取代、缺失或插入之胺基酸殘基之總數也可為0。

【0059】

改造脗水合酶之 α 次單元中，末端附加之胺基酸殘基之數目可為例如：每一末端1~60，或1~40，或1~20，或1~10，或1~5，或1~3，或1。附加之胺基酸殘基的數目也可為0。

改造脗水合酶之 β 次單元中，末端附加之胺基酸殘基之數目可為例如：每一末端1~60，或1~40，或1~20，或1~10，或1~5，或1~3，或1。附加之胺基酸殘基的數目也可為0。

末端附加胺基酸殘基，可為例如：分泌信號序列。末端附加胺基酸殘基可僅存在於N末端，僅存在於C末端，或N末端及C末端兩者皆存在。

【0060】

改造脞水合酶與來自野生型嗜熱假諾卡氏菌之脞水合酶之類似性，亦能夠以序列同一性來表達。

改造脞水合酶之 α 次單元之胺基酸序列，在和序列編號1表示之來自野生型嗜熱假諾卡氏菌之脞水合酶之 α 次單元之胺基酸序列之間，例如具有90%以上之序列同一性，或具有95%以上之序列同一性，或具有96%以上之序列同一性，或具有97%以上之序列同一性，或具有98%以上之序列同一性，或具有99%以上之序列同一性。

【0061】

改造脞水合酶之 β 次單元之胺基酸序列，在和序列編號2表示之來自野生型嗜熱假諾卡氏菌之脞水合酶之 β 次單元之胺基酸序列之間，例如：具有90%以上之序列同一性，或具有95%以上之序列同一性，或具有96%以上之序列同一性，或具有97%以上之序列同一性，或具有98%以上之序列同一性，或具有99%以上之序列同一性。

【0062】

序列彼此之比對，可利用ClustalW(1.83)進行，可使用初始參數(包括空位開放罰分(gap open penalty)：10、空位擴展罰分(gap extension penalty)：0.05)來進行。又，序列同一性係按脞水合酶之全長算出。

【0063】

將改造脞水合酶之胺基酸序列和來自野生型嗜熱假諾卡氏菌之脞水合酶之胺基酸序列比對時，取決於改造脞水合酶之改造之樣式，有時即使是就比對上為對應之胺基酸殘基彼此，也會有如上述規定之次單元之N末端起之距離不同的情形。

本揭示中，於如此的情形，針對改造脞水合酶，次單元之N末端起第X位之胺基酸殘基，係和指來自野生型嗜熱假諾卡氏菌之脞水合酶之該次單元之N末端起第X位之胺基酸殘基就比對上對應之胺基酸殘基。

例如：本揭示中，「 α 次單元之N末端起第23位之胺基酸殘基」、「 α 次單元之N末端起第23位之Ala殘基」或「 α 次單元之N末端起第23位之胺基酸殘基Ala殘基」，可能是位在改造脞水合酶之胺基酸序列上， α 次單元之N末端起第23位以外之位置。

例如：改造脞水合酶之 α 次單元之N末端起第23位之胺基酸殘基(亦可不須為Ala)，因為胺基酸殘基之插入之結果，可能會對應於來自野生型嗜熱假諾卡氏菌之脞水合酶之 α 次單元之N末端起第24位之胺基酸殘基Ala殘基。如此的情形，本揭示中之說明中之「 α 次單元之N末端起第23位之胺基酸殘基」、「 α 次單元之N末端起第23位之Ala殘基」或「 α 次單元之N末端起第23位之胺基酸殘基Ala殘基」，係指改造脞水合酶中之 α 次單元之N末端起第24位之胺基酸殘基。

【0064】

就一態樣而言，改造脞水合酶之胺基酸序列，也可為國際公開第2010/055666號及國際公開2018/124247號記載之改造脞水合酶之胺基酸序列或和其類似之序列。

【0065】

本揭示之變異型脞水合酶之製造方法，無特殊限制，例如可準備含有編碼本揭示之變異型脞水合酶之胺基酸序列之核苷酸序列表示之核酸之載體，利用此載體來產生變異型脞水合酶。以下詳細說明。

【0066】

<核酸>

本揭示之核酸，編碼本揭示之變異型脞水合酶之胺基酸序列。更具體而言，本揭示之核酸具有編碼本揭示之變異型脞水合酶之胺基酸序列之核苷酸序列。

作為合成編碼本揭示之變異型脞水合酶之胺基酸序列之核苷酸序列之方法，可列舉對於編碼對應之來自野生型之嗜熱假諾卡氏菌之脞水合酶之核苷酸序列導入變異點之方法、將含有變異點之全部核苷酸序列以化學合成之方法等。

將編碼來自野生型之嗜熱假諾卡氏菌之脞水合酶之核苷酸序列作為模板而使基因產生變異之方法，例如：部位專一性變異法(Kramer,W. and frita,H.J., Methods in Enzymology, vol.154, p.350(1987))、重組 PCR 法 (PCR Technology,Stockton Press(1989))、將特定部分核酸予以化學合成之方法、將基因進行羥基胺處理之方法、對攜帶基因之菌株進行紫外線照射之方法、以亞硝基胍、亞硝酸等化學藥劑處理之方法；使用市售之突變導入套組之方法；等。

本揭示之核酸可為去氧核糖核酸(DNA)也可為核糖核酸(RNA)。

【0067】

編碼來自野生型之嗜熱假諾卡氏菌之脞水合酶之基因，係由序列編號3表示之核苷酸序列、及序列編號4表示之核苷酸序列構成。

序列編號3表示之核苷酸序列，對應於由序列編號1構成之胺基酸序列，序列編號4表示之核苷酸序列，對應於由序列編號2構成之胺基酸序列。

編碼變異型脞水合酶之核酸，至少在序列編號3表示之核苷酸序列或序列編號4表示之核苷酸序列中之前述(a)~(q)之胺基酸殘基取代位置，具有和選自前述(a)~(q)之胺基酸殘基取代群中之至少1個以上之胺基酸殘基取代對應之核苷酸取代。

【0068】

<載體>

本揭示之載體含有本揭示之核酸。

本揭示之載體，例如對於公知之載體導入了本揭示之變異型脞水合酶者。
本揭示之載體可為噬菌體載體也可為質體載體。

【0069】**<表現載體>**

本揭示之載體宜為表現載體較佳。

表現載體，也可為含有以編碼本揭示之變異型脞水合酶之胺基酸序列之核苷酸序列表示之核酸之表現載體。依本揭示之表現載體，藉由將任意之寄主細胞轉形並取得轉形體或細胞株，然後培養前述轉形體、細胞株，可產生本揭示之變異型脞水合酶。

【0070】

表現載體，視需要，除了含有編碼本揭示之變異型脞水合酶之核苷酸序列以外，也可含有構成其他區域之核苷酸序列(以下也簡稱「其他區域」)。

其他區域，例如：前述轉形體為了產生變異型脞水合酶必要之控制區域、為了自主複製所必要之區域等。

【0071】

為了產生前述變異型脞水合酶所必要之控制區域，例如啟動子序列(包括控制轉錄之操縱子序列)、核糖體結合序列(SD序列)、轉錄終結序列等。

【0072】

啟動子序列，例如來自大腸菌之色胺酸操縱組之trp啟動子、乳糖操縱組之lac啟動子、來自lambda噬菌體之PL啟動子及PR啟動子等。又，也可利用如tac啟動子、trc啟動子之人為的設計、改造之序列。

【0073】

前述控制區域在表現載體上之序列順序無特殊限制，例如：啟動子序列與核糖體結合序列，宜位在比起編碼本揭示之變異型脞水合酶之基因更5'末端側之

上游。又，轉錄終結序列，宜位在比起編碼本揭示之變異型脞水合酶之基因更3'末端側之下游。又，可為利用本控制區域使變異型脞水合酶之 α 次單元基因及 β 次單元基因以各自獨立之順反子的形式表現，也可利用共通的控制區域而以多順反子的形式表現。

【0074】

考量容易選擇前述轉形體之觀點，表現載體也可更含有編碼可能成為選擇標記之選擇基因之核苷酸序列。

【0075】

亦可使表現載體和編碼涉及脞水合酶之活化之蛋白質的基因一起表現。前述涉及脞水合酶之活化之蛋白質，係具有該蛋白質有無表現直接會左右脞水合酶之活化之性質之蛋白質，可列舉日本特開平11-253168號公報記載之涉及來自嗜熱假諾卡氏菌之脞水合酶活化之蛋白質(脞水合酶活化蛋白質)為其代表例。又，前述脞水合酶活化蛋白質之序列以序列編號36表示。

【0076】

將表現載體對於所望之寄主細胞轉形之方法、及使前述轉形體內產生脞水合酶之方法等，例如可採用「Molecular Cloning 3rd Edition」(J.Sambrook等人;Cold Spring Harbor Laboratory Press,2001)等記載之分子生物學、生物工程、及基因工程之領域公知之一般方法、寄主細胞。

【0077】**<轉形體>**

本揭示之轉形體含有本揭示之表現載體。

依本揭示之轉形體，會產生即使雜質存在下仍可減少由於雜質所致之對於使用脞水合酶之醯胺化合物生成反應之抑制之變異型脞水合酶。

本揭示之轉形體可依公知之方法製作。例如：建構含有編碼變異型脛水合酶之核苷酸序列、及視需要之上述其他區域之表現載體，並將表現載體對於所望寄主細胞進行轉形之方法等。具體而言，可利用Sambrook,J.,et.al.,”Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3rd Edition”, Cold Spring Harbor Laboratory Press,(2001)等記載之分子生物學、生物工程及基因工程之領域公知之一般的方法。

【0078】

轉形體，不只在寄主細胞納入表現載體，亦可視需要一併進行導入靜默變異等，以使在寄主細胞之使用頻度低的密碼子成為使用頻度高的密碼子來製作。藉此，有可能使納入了表現載體之來自變異型脛水合酶之蛋白質之產量增加。

【0079】

針對靜默變異之導入，若為配合密碼子於寄主細胞之使用頻度，調整使位在表現載體上之該脛水合酶基因及使該脛水合酶基因分泌到細胞外之信號序列密碼子之方法即可，靜默變異導入的方法、變異點、變更之核苷酸之種類等無特殊限制。

【0080】

<變異型脛水合酶之製造方法>

本揭示之變異型脛水合酶之製造方法，也可為包括將前述本揭示之轉形體在培養基中培養、及從培養的轉形體及培養基中之至少一者回收本揭示之變異型脛水合酶之變異型脛水合酶之製造方法。

【0081】

(轉形體之培養方法)

以表現載體轉形而獲得之轉形體之培養之條件，和轉形前之寄主細胞之培養條件同樣，可使用公知之條件。

寄主細胞例如原核生物(大腸菌、枯草菌、放線菌等)、酵母、絲狀菌等。

培養基只要是適量含有碳源、氮源、無機物及其他營養素之培養基即可，合成培養基或天然培養基皆可使用。

培養基成分可使用培養基使用之公知之成分。例如可將肉萃取物、酵母萃取物、麥芽萃取物、蛋白胨、NZ胺及馬鈴薯等有機營養源、葡萄糖、麥芽糖、蔗糖、澱粉及有機酸等碳源、硫酸銨、尿素及氯化銨等氮源、磷酸鹽、鎂、鉀及鐵等無機營養源、維生素類予以適當組合使用。

又，經含有選擇標記之表現載體轉形之轉形體之培養，例如於選擇標記為藥劑耐性時，使用含有與其對應之藥劑之培養基，於選擇標記為營養要求性時，使用不含與其對應之營養素之培養基即可。

培養基之pH，可在pH4~pH8之範圍適當選擇。

轉形體之培養方法，可使用含有轉形體之液體培養基之振盪培養、通氣攪拌培養、連續培養、流加培養等通常的培養方法進行。

培養條件，利用轉形體、培養基、及培養方法之種類適當選擇即可，只要是轉形體會生長並產生變異型脛水合酶之條件即可，無特殊限制。

培養溫度較佳為於20°C~45°C，又更佳為24°C~37°C進行好氣性培養。

培養期間，只要是在1日~7日之範圍內培養至具有目的變異型脛水合酶活性之蛋白質之含量成為最大即可。

【0082】

例如：寄主細胞為大腸菌時，培養前述轉形體之培養基一般係使用LB培養基、M9培養基等，但更佳為在如此的培養基中含有Fe離子及Co離子0.1μg/mL以

上作為成分之培養基。將前述轉形體植菌在培養基後，於適當培養溫度(一般而言，20°C~50°C)使其生長即可。

【0083】

(變異型脞水合酶回收步驟)

變異型脞水合酶之製造方法，宜含有從培養之轉形體及培養後之培養基中之至少任一者回收變異型脞水合酶之步驟較佳。

【0084】

將已轉形之轉形體培養後回收變異型脞水合酶之方法，可使用在此領域慣用之方法。

變異型脞水合酶被分泌到轉形體外時，可藉由將轉形體之培養物進行離心分離、過濾等而輕易地獲得含有變異型脞水合酶之粗酵素液。

變異型脞水合酶係蓄積在轉形體內時，可藉由將已培養之轉形體利用離心分離等回收後，將回收的轉形體懸浮於緩衝液，對此懸浮液依溶菌酶處理、冷凍融解、超音波破碎等公知之方法將轉形體之細胞膜破壞，以回收含有變異型脞水合酶之粗酵素液。

【0085】

也可在已回收之含有變異型脞水合酶之粗酵素液添加陽離子性高分子，並添加過濾助劑及過濾。經過濾之含有變異型脞水合酶之酵素液，可更利用超過濾法等濃縮並加入防腐劑等，作為濃縮的變異型脞水合酶(濃縮酵素)的形態利用。又，變異型脞水合酶濃縮後，亦可利用噴灑乾燥法等製成變異型脞水合酶之粉末(粉末酵素)。

針對回收的含有變異型脞水合酶的粗酵素液，當需要分離精製時，例如可將利用硫酸銨等所為之鹽析、利用醇等所為之有機溶劑沉澱法、利用透析及超

過濾等所為之膜分離法、或離子交換體層析、逆相高速層析、親和層析、凝膠過濾層析等公知之層析分離法適當組合而分離精製。

【0086】

<醯胺化合物之製造方法>

本揭示之醯胺化合物之製造方法，包括使本揭示之變異型脞水合酶接觸脞化合物之步驟。本揭示之變異型脞水合酶，會催化從脞化合物合成醯胺化合物之反應。依本揭示之醯胺化合物之製造方法，即使在雜質存在下，仍會減小雜質所致之對於使用脞水合酶之醯胺化合物生成反應之抑制。

【0087】

首先，培養產生本揭示之變異型脞水合酶之轉形體、細胞株，使獲得之培養液、細胞或細胞處理物在介質中與脞化合物接觸。藉此，本揭示之變異型脞水合酶和脞化合物接觸，本揭示之變異型脞水合酶將脞化合物變換為對應之醯胺化合物。在此所指之細胞處理物，係代表來自該轉形體之萃取物、磨碎物、將該等萃取物、磨碎物之脞水合酶活性級分分離而獲得之粗酵素製備物、將進一步精製獲得之酵素精製物等後分離物、該轉形體、該轉形體之萃取物、磨碎物或後分離物使用適當手段予以固定化而得之固定化物。

上述接觸之溫度，較佳為本揭示之變異型脞水合酶不失活之溫度範圍內，更佳為0°C~60°C，又更佳為15°C~40°C。例如可將培養了產生本揭示之變異型脞水合酶之轉形體、細胞株的培養液，直接添加在含有脞化合物之水溶液中，或將培養液予以離心處理而將菌體分離，並將菌體添加在含有脞化合物之水溶液。反應時水溶液之pH為7~9較佳，7.5~8.5更佳。脞化合物能在水溶液中例如以0.25體積%~20.0體積%，更佳為2.0體積%~5.0體積%之濃度存在。轉形體之培養之詳情，如變異型脞水合酶之製造方法之項目所述。

【0088】

上述腈化合物之具體例只要是對於本揭示之變異型腈水合酶能作為基質作用之化合物即可，不特別限定，例如以乙腈、丙腈、琥珀腈、己二腈為例之脂肪族飽和腈、以丙烯腈、甲基丙烯腈為例之脂肪族不飽和腈、以苯甲腈、鄰苯二甲腈為例之芳香族腈及以3-氰基吡啶、2-氰基吡啶為例之雜環族腈等。

本揭示的方法中，腈化合物中之腈基利用水合而變換為醯胺基，故例如：丙烯腈可變換為丙烯醯胺。

【0089】

然後，不使本揭示之變異型腈水合酶失活而在介質中添加活性碳，藉此，不使從使用本揭示之變異型腈水合酶作為觸媒之腈化合物合成醯胺化合物之反應結束而將生成之醯胺化合物予以精製。

【0090】

又，藉由和本揭示之變異型腈水合酶接觸而從腈化合物製造醯胺化合物之反應，也可配合腈水合酶之最適pH，例如在pH7~9這樣的中性~鹼性之條件進行。pH，例如可在緩衝液中視需要使用氨、氫氧化鈉這樣的鹼性物質以調節。

[實施例]

【0091】

依以下之實施例對於實施形態更詳細說明，但是本發明不受以下之實施例有任何限定。又，以下之實施例中，「變異處」係指和具有序列編號1表示之胺基酸序列之 α 次單元及具有序列編號2表示之胺基酸序列之 β 次單元之來自野生型嗜熱假諾卡氏菌之腈水合酶在胺基酸序列上之差異之位置。

【0092】

(比較用之來自野生型嗜熱假諾卡氏菌之腈水合酶(C1)之取得)

於30mL之試管製備10mL之LB液體培養基，利用於121°C、20分鐘之條件之高壓釜將該液體培養基滅菌。對此液體培養基添加安皮西林使終濃度成為

100 μ g/mL後，植菌一鉅耳之專利文獻1、實施例3記載之細胞株MT-10822，於37°C、300rpm進行約20小時培養。之後，分取獲得之培養液1mL到適當離心管後，利用離心分離(15000rpm \times 5分鐘)將該菌體分離。

然後，從利用鹼性SDS萃取法分離獲得之菌體製備質體pPT-DB1。將製備之質體對於大腸菌HB101之勝任細胞(東洋紡公司製)轉形，獲得轉形體(C1)。轉形體(C1)，會產生來自野生型嗜熱假諾卡氏菌之脲水合酶脲水合酶(C1)。

【0093】

(比較用之變異型脲水合酶(C2)之取得)

依國際公開第2010/055666號之比較例2記載的方法，實施使用了寶酒造公司製之「LA PCR in vitro mutagenesis Kit」(以下也稱為變異導入套組。)之部位專一性變異導入。具體而言，以來自野生型嗜熱假諾卡氏菌之脲水合酶表現質體pPT-DB1作為模板，取得表現來自野生型嗜熱假諾卡氏菌之脲水合酶之 α 次單元之N末端起第92位之胺基酸殘基Asp取代成Glu之變異型脲水合酶之轉形體。此轉形體會產生比較用變異型脲水合酶(C2)。以下將如序列編號5之序列之含有欲導入之變異序列之引子也稱為變異用引子。

【0094】

(本揭示之變異型脲水合酶(1)之取得)

為了取得表現 α 次單元中之序列編號1之N末端起第23位之胺基酸殘基Ala取代成Gly之變異型脲水合酶之轉形體，實施使用了寶酒造公司製之「LA PCR in vitro mutagenesis Kit」(以下稱為變異導入套組)之變異導入。將來自野生型嗜熱假諾卡氏菌之脲水合酶表現質體pPT-DB1作為模板，進行PCR反應。

PCR反應No.1，係在含有表5所示序列編號之變異用引子及M13引子M4(序列編號33記載序列)50pmol之全部量50 μ L之系(組成依變異導入套組記載之條

件)，重複進行25回合熱變性(98°C)15秒、黏合(55°C)30秒、延長反應(72°C)120秒之條件以進行。

PCR反應No.2，係在含有MUT4引子(序列編號34記載序列)及M13引子RV(序列編號35記載序列)各50pmol之全部量50 μ L之系(組成依變異導入套組記載之條件)，進行和PCR反應No.1同樣的操作以進行。

【0095】

利用使用了PCR反應No.1及No.2之反應結束液各5 μ L之瓊脂糖電泳(瓊脂糖濃度1.0重量%)進行DNA增幅產物之分析，結果可確認增幅DNA產物之存在。

使用Microcon100(寶酒造公司製)由各自之PCR反應結束液去除過量的引子及dNTP後，加入TE，製備各自的50 μ L之溶液。製備各含有該TE溶液0.5 μ L之全部量47.5 μ L之黏合溶液(組成依變異導入套組記載之條件)，進行熱變性處理(98°C)10分鐘。之後，費時60分鐘以一定速度冷卻直到成為37°C，然後於37°C保持15分鐘以進行黏合處理。

於黏合處理後之溶液加入TaKaRa LA Taq 0.5 μ L，於72°C進行3分鐘加熱處理，完成異質雙股。

於其中加入前述M13引子M4及前述M13引子RV各50pmol，使全部量成為50 μ L。之後，以熱變性(98°C)15秒、黏合(55°C)30秒、延長反應(72°C)120秒之條件重複進行25回合，以進行PCR反應No.3。

【0096】

利用使用了PCR反應No.3之反應結束液5 μ L之瓊脂糖電泳(使用SIGMA公司製VII型低熔點瓊脂糖；瓊脂糖濃度0.8重量%)來進行DNA增幅產物之分析，結果確認有約2kb之增幅DNA產物之存在。

然後，從瓊脂糖凝膠僅切出約2Kb的DNA斷片，使該瓊脂糖片(約0.1g)微細粉碎而懸浮在1mL之TE溶液。之後，於55°C保溫1小時，使瓊脂糖完全融解。

對此融解液進行苯酚/氯仿萃取及乙醇沈澱，將DNA斷片精製，最終溶解在10 μ L之TE。

將精製之約2kb之增幅DNA斷片以限制酶EcoRI及HindIII切斷。之後對此限制酶處理液進行苯酚/氯仿萃取及乙醇沈澱，將DNA斷片精製，最終溶解在10 μ L的TE。

同樣，利用EcoRI及HindIII將脞水合酶表現質體pPT-DB1切斷，進行瓊脂糖凝膠電泳(SIGMA公司製VII型低熔點瓊脂糖使用；瓊脂糖濃度0.7%)，從瓊脂糖凝膠僅切出約2.7Kb之DNA斷片。

將切出的瓊脂糖片(約0.1g)微細粉碎，使其懸浮在1mL之TE溶液。之後，於55°C保溫1小時，使瓊脂糖完全融解。

對此融解液進行苯酚/氯仿萃取及乙醇沈澱，將DNA斷片精製，最終溶解在10 μ L之TE。

將依此方式獲得之約2kb及約2.7Kb之DNA斷片，使用DNA接合套組(寶酒造公司製)連結。之後，將大腸菌HB101之勝任細胞(東洋紡公司製)轉形，獲得轉形體(1)。又，從上述菌體利用鹼性SDS萃取法製備質體，以DNA定序儀決定脞水合酶基因部分之核苷酸序列。質體pPT-DB1確認具有 α 次單元之N末端起第23位之胺基酸殘基Ala成為Gly之變異。轉形體(1)會產生具有表5記載之變異之變異型脞水合酶(1)。

【0097】

(本揭示之變異型脞水合酶(2)~(17)之取得)

為了取得表現具有表5所示之胺基酸殘基取代之變異型脞水合酶的轉形體(2)~(17)，將序列編號5之引子替換為使用序列編號6~21之引子，除此以外和轉形體(1)同樣進行，獲得質體，獲得轉形體(2)~(17)。轉形體(2)~(17)會產生具有表5記載之變異之脞水合酶(2)~(17)。

【0098】

(本揭示之變異型脞水合酶(18)~(28)之取得)

為了取得表現具有表6所示之胺基酸殘基取代之變異型脞水合酶之轉形體(18)，將作為模板之pPT-DB1替換為由轉形體(9)獲得質體，變異用引子使用序列編號18之變異用引子，除此以外和轉形體(1)同樣進行，獲得質體，並獲得轉形體(18)。轉形體(18)，會產生具有表6記載之變異之脞水合酶(18)。

同樣，從由轉形體(9)獲得之質體及序列編號15之變異用引子獲得脞水合酶(19)、從由轉形體(13)獲得之質體及序列編號11之變異用引子獲得脞水合酶(20)、從由轉形體(10)獲得之質體及序列編號18之變異用引子獲得脞水合酶(21)、從由轉形體(9)獲得之質體及序列編號11之變異用引子獲得脞水合酶(22)、從由轉形體(16)獲得之質體及序列編號21之變異用引子獲得脞水合酶(23)、從由轉形體(1)獲得之質體及序列編號7之變異用引子獲得脞水合酶(24)、從由轉形體(6)獲得之質體及序列編號19之變異用引子獲得脞水合酶(25)、從由轉形體(17)獲得之質體及序列編號22之變異用引子獲得脞水合酶(26)、從由轉形體(5)獲得之質體及序列編號23之變異用引子獲得脞水合酶(27)、從由轉形體(7)獲得之質體及序列編號24之變異用引子獲得脞水合酶(28)。

【0099】

(本揭示之變異型脞水合酶之取得(29)~(37)之取得)

為了取得表現具有如表7所示之胺基酸殘基取代之變異型脞水合酶之轉形體(29)，將作為模板之pPT-DB1替換為由轉形體(18)獲得質體，變異用引子使用序列編號11之變異用引子，除此以外和轉形體(1)同樣進行而獲得質體，獲得轉形體(29)。轉形體(29)會產生具有表7記載之變異之脞水合酶(29)。

同樣，從由轉形體(21)獲得之質體及序列編號13之變異用引子獲得脞水合酶(30)、從由轉形體(20)獲得之質體及序列編號6之變異用引子獲得脞水合酶(31)、

從由轉形體(20)獲得之質體及序列編號16之變異用引子獲得脞水合酶(32)、從由轉形體(20)獲得之質體及序列編號18之變異用引子獲得脞水合酶(33)、從由轉形體(9)獲得之質體及由序列編號16之變異用引子獲得之轉形體所獲得之質體及序列編號17之變異用引子獲得脞水合酶(34)、從由轉形體(23)獲得之質體及序列編號11之變異用引子獲得脞水合酶(35)、從由轉形體(15)獲得之質體及由序列編號25之變異用引子獲得之轉形體所獲得之質體及序列編號26之變異用引子獲得脞水合酶(36)、從由轉形體(8)獲得之質體及由序列編號27之變異用引子獲得之轉形體所獲得之質體及序列編號28之變異用引子獲得脞水合酶(37)。

【0100】

(本揭示之變異型脞水合酶之取得(38)~(46))

為了取得表現具有如表8所示之胺基酸殘基取代之變異型脞水合酶之轉形體(38)，將作為模板之pPT-DB1替換為由轉形體(30)獲得質體，變異用引子使用序列編號11之變異用引子，除此以外和轉形體(1)同樣進行而獲得質體，獲得轉形體(38)。轉形體(38)會產生具有表8記載之變異之脞水合酶(38)。

同樣，從由轉形體(29)獲得之質體及序列編號17之變異用引子獲得脞水合酶(39)、從由轉形體(34)獲得之質體及序列編號11之變異用引子獲得脞水合酶(40)、從由轉形體(35)獲得之質體及序列編號19之變異用引子獲得脞水合酶(41)、從由轉形體(8)獲得之質體及由序列編號22之變異用引子獲得之轉形體所獲得之質體及由序列編號27之變異用引子獲得之轉形體所獲得之質體及序列編號32之變異用引子獲得脞水合酶(42)、從由轉形體(40)獲得之質體及序列編號18之變異用引子獲得脞水合酶(43)、從由轉形體(40)獲得之質體及序列編號29之變異用引子獲得脞水合酶(44)、從由轉形體(35)獲得之質體及由序列編號27之變異用引子獲得之轉形體所獲得之質體及序列編號28之變異用引子獲得脞水合酶(45)、從由轉形體(1)獲得之質體及由序列編號11之變異用引子獲得之轉形體所獲

得之質體及由序列編號29之變異用引子獲得之轉形體所獲得之質體及由序列編號30之變異用引子獲得之轉形體所獲得之質體及序列編號31之變異用引子獲得脞水合酶(46)。

【0101】

表5~表10中，於項目「模板」記載得到質體之轉形體之編號、項目「變異用引子」記載作為變異用引子使用之引子之序列編號、項目「變異前之胺基酸殘基」記載項目「變異處」記載之變異位置於變異前之胺基酸殘基(即來自野生型嗜熱假諾卡氏菌之脞水合酶(C1)之胺基酸殘基)、項目「變異後之胺基酸殘基」記載於項目「變異處」記載之變異位置於變異後之胺基酸殘基。

【0102】

[實施例1-1~1-17、2-1~2-11、3-1~3-9、4-1~4-9、B2~B7、C1~C5、比較例1、2-1、2-2、3~4、及參考例1~3]

【0103】

<由於雜質所致反應抑制之抑制度評價>

使用產生各編號之脞水合酶之轉形體，依下列方式進行雜質存在下之醯胺化合物之生成反應。

於試管製備含有40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硫酸鐵(III)·七水合物及10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之氯化鈷·二水合物之5mL之LB液體培養基，利用121 $^{\circ}\text{C}$ 、20分鐘高壓釜滅菌。於此培養基添加安皮西林使終濃度成為100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。之後，以1鉑耳之量植菌各轉形體，於37 $^{\circ}\text{C}$ 以200rpm分別培養約20小時。取培養結束後之培養基1000 μl ，離心分離並回收菌體。使此菌體懸浮在含有1000質量ppm之丙烯醛之780 μL 之50mM Tris-HCl水溶液(pH8.0)。於此懸浮液中添加丙烯脞20 μL ，按表5~表10所示溫度邊緩慢攪拌邊反應60分鐘。

【0104】

反應結束後，使用HPLC按下列分析條件進行反應液中含有的醯胺化合物(丙烯醯胺)之量之定量分析。

【0105】

藉由將「於雜質存在下使用各編號之脞水合酶獲得之醯胺化合物之量(X)」與「在雜質存在下使用來自野生型嗜熱假諾卡氏菌之脞水合酶(C1)獲得之比較例1之醯胺化合物之量(Y)」予以對比，求各例之變異型脞水合酶擁有之從脞化合物生成醯胺化合物之酵素活性之相對大小，定義為由雜質所致之反應抑制之抑制程度(X/Y)。例如：比較例1中，係和相同比較例1之結果對比，故由雜質所致之反應抑制之抑制程度之值成為1.000。

參考例1中，將「於雜質不存在下使用脞水合酶(1)獲得之醯胺化合物之量」、與「於雜質存在下使用脞水合酶(1)獲得之實施例1-1之醯胺化合物之量」予以對比。

參考例2中，將「於雜質不存在下使用脞水合酶(C1)獲得之醯胺化合物之量」、與「於雜質存在下使用脞水合酶(C1)獲得之比較例1之醯胺化合物之量」予以對比。

參考例3中，將「於雜質不存在下使用脞水合酶(C2)獲得之醯胺化合物之量」、與「於雜質存在下使用脞水合酶(C2)獲得之比較例2-1之醯胺化合物之量」予以對比。

【0106】

結果示於各表。又，反應及分析，係針對使用了各脞水合酶之例進行3次以上，並校正於分注操作等之數據之變異。

【0107】

<分析條件>

分析設備：日本分光公司製之HPLC

管柱：YMC Pack ODS-A(150×6.00mm)

分析溫度：40°C

移動相：3%乙醇、10mM磷酸

(0108)

[表5]

	靜水合酶					反應溫度(°C)	內酯化之濃度(ppm)	由於雜質所致之反應抑制之抑制度
	靜水合酶編號	變異用字	變異處	變異前之氨基酸殘基	變異後之氨基酸殘基			
參考例1	WT	序列編號5	222	Ala	Ala	30	10000	100%
參考例2	WT	6	6	Asp	Asp	30	10000	100%
參考例3	WT	9	9	Asp	Asp	30	10000	100%
實施例1	WT	6	6	Asp	Asp	30	10000	100%
實施例2-1	WT	6	6	Asp	Asp	30	10000	100%
實施例1-1	WT	序列編號5	222	Ala	Ala	30	10000	100%
實施例1-2	WT	序列編號6	223	Ala	Ala	30	10000	100%
實施例1-3	WT	序列編號7	224	Ala	Ala	30	10000	100%
實施例1-4	WT	序列編號8	225	Ala	Ala	30	10000	100%
實施例1-5	WT	序列編號9	226	Ala	Ala	30	10000	100%
實施例1-6	WT	序列編號10	227	Ala	Ala	30	10000	100%
實施例1-7	WT	序列編號11	228	Ala	Ala	30	10000	100%
實施例1-8	WT	序列編號12	229	Ala	Ala	30	10000	100%
實施例1-9	WT	序列編號13	230	Ala	Ala	30	10000	100%
實施例1-10	WT	序列編號14	231	Ala	Ala	30	10000	100%
實施例1-11	WT	序列編號15	232	Ala	Ala	30	10000	100%
實施例1-12	WT	序列編號16	233	Ala	Ala	30	10000	100%
實施例1-13	WT	序列編號17	234	Ala	Ala	30	10000	100%
實施例1-14	WT	序列編號18	235	Ala	Ala	30	10000	100%
實施例1-15	WT	序列編號19	236	Ala	Ala	30	10000	100%
實施例1-16	WT	序列編號20	237	Ala	Ala	30	10000	100%
實施例1-17	WT	序列編號21	238	Ala	Ala	30	10000	100%

(0109)

[表6]

實施例	船水合酶			反應後之底物			反應溫度 (°C)	內標準之濃度 (ppm)	相對於雜質所換之反應抑制之抑制度
	濃度	時間	產率	雙引之	雙引之	雙引之			
實施例 1	100	10	100	100	100	100	20	1000	1.250
實施例 2	100	10	100	100	100	100	20	1000	1.251
實施例 3	100	10	100	100	100	100	20	1000	1.252
實施例 4	100	10	100	100	100	100	20	1000	1.253
實施例 5	100	10	100	100	100	100	20	1000	1.254
實施例 6	100	10	100	100	100	100	20	1000	1.255
實施例 7	100	10	100	100	100	100	20	1000	1.256
實施例 8	100	10	100	100	100	100	20	1000	1.257
實施例 9	100	10	100	100	100	100	20	1000	1.258
實施例 10	100	10	100	100	100	100	20	1000	1.259
實施例 11	100	10	100	100	100	100	20	1000	1.260

(0110)

[表 1]

實施例	船水合酶			反應後之底物			反應溫度 (°C)	內標準之濃度 (ppm)	相對於雜質所換之反應抑制之抑制度
	濃度	時間	產率	雙引之	雙引之	雙引之			
實施例 1	100	10	100	100	100	100	20	1000	1.250
實施例 2	100	10	100	100	100	100	20	1000	1.251
實施例 3	100	10	100	100	100	100	20	1000	1.252
實施例 4	100	10	100	100	100	100	20	1000	1.253
實施例 5	100	10	100	100	100	100	20	1000	1.254
實施例 6	100	10	100	100	100	100	20	1000	1.255
實施例 7	100	10	100	100	100	100	20	1000	1.256
實施例 8	100	10	100	100	100	100	20	1000	1.257
實施例 9	100	10	100	100	100	100	20	1000	1.258

(0111)

實施例編號	胺基酸編號	胺基酸		反應溫度(°C)	丙酮離之溫度(ppm)	由於雜質所致之反應抑制之抑制度	
		雙異處	雙異前之胺基酸殘基				雙異後之胺基酸殘基
比較例1	11	α128	Ala	Gly	20	1000	1.125
比較例2	12	β122	Ala	Ile	20	700	0.947
比較例3	23	β115	Thr	Val	20	400	0.783
比較例4	33	α188	Ala	Thr	20	1000	1.278
		β186	Thr	Lys			
實施例C1	9	β122	Gly	Val	30	1000	1.120
		α180	Ala	Ile			
實施例C2	22	β122	Ala	Ile	30	1000	1.210
		α188	Thr	Lys			
實施例C3	35	β50	Glu	Gly	30	1000	1.230
		α180	Gly	Val			
實施例C4	34	β122	Ala	Ile	30	1000	1.320
		β189	Cys	Scr			
實施例C5	40	β122	Ala	Ile	30	1000	1.450
		β189	Cys	Scr			
		β207	Glu	Gly			
		α180	Gly	Val			

(0113)

[表10]

比較例/實施例	胺基酸編號	胺基酸		反應溫度(°C)	丙酮離之溫度(ppm)	由於雜質所致之反應抑制之抑制度	
		雙異處	雙異前之胺基酸殘基				雙異後之胺基酸殘基
比較例1	C1	20	1000	1.000	
比較例2	C2	α92	Asp	Glu	20	1000	0.947
比較例3	C1	30	1000	0.783	
比較例4	C2	α92	Asp	Glu	30	1000	0.752
實施例C1	9	β122	Ala	Ile	30	1000	1.120
實施例C2	22	α180	Gly	Val	30	1000	1.210
		β122	Ala	Ile			
實施例C3	35	α188	Thr	Lys	30	1000	1.230
		β50	Glu	Gly			
實施例C4	34	β122	Ala	Ile	30	1000	1.320
		β189	Cys	Scr			
實施例C5	40	β122	Ala	Ile	30	1000	1.450
		β189	Cys	Scr			
		β207	Glu	Gly			
		α180	Gly	Val			

【0114】

如表5所示，針對野生型脞水合酶(C1)，若將在雜質存在下進行了反應之比較例1、與在未添加雜質下進行了反應之參考例2予以對比，相較於未添加雜質時，酵素活性降低，可知由於雜質導致反應受抑制。又，比較例用之變異型脞水合酶(C2)，也和前述(C1)同樣，若將在雜質存在下進行了反應之比較例2-1、與在未添加雜質下進行了反應之參考例3予以對比，相較於未添加雜質時，酵素活性降低，可知由於雜質導致反應受抑制。

反觀本揭示之變異型脞水合酶，分別和野生型脞水合酶(C1)、比較例用之變異型脞水合酶(C2)對比，添加雜質而進行了反應時之酵素活性、與未添加雜質下進行了反應時之酵素活性之差距小。更具體而言，實施例1-1中之「由雜質所致之反應抑制之抑制度」之值與參考例1中之「由雜質所致之反應抑制之抑制度」之值之差距($2.013-1.125=0.888$)，比起比較例1中之「由雜質所致之反應抑制之抑制度」之值與參考例2中之「由雜質所致之反應抑制之抑制度」之值之差距($1.994-1.000=0.994$)小。又，實施例1-1中之「由雜質所致之反應抑制之抑制度」之值與參考例1中之「由雜質所致之反應抑制之抑制度」之值之差距($2.013-1.125=0.888$)，比起比較例2-1中之「由雜質所致之反應抑制之抑制度」之值與參考例3中之「由雜質所致之反應抑制之抑制度」之值之差距($2.263-0.960=1.303$)小。亦即，本揭示之變異型脞水合酶，即使在雜質存在下，由於雜質所致之對於使用脞水合酶之醯胺化合物生成反應之抑制仍可減小。

【0115】

如各表5~10所示，可知對於來自野生型嗜熱假諾卡氏菌之脞水合酶進行了屬於由前述(a)~(q)構成之群組之胺基酸殘基取代之各實施例之變異型脞水合酶，相較於比較例1之來自野生型嗜熱假諾卡氏菌之脞水合酶及比較例2-1之改造

脞水合酶，即使在雜質存在下仍可減小由於雜質所致對於使用脞水合酶之醯胺化合物生成反應之抑制。

【0116】

如表9所示，可知對於來自野生型嗜熱假諾卡氏菌之脞水合酶進行了屬於由前述(a)~(q)構成之群組之胺基酸殘基取代之各實施例之變異型脞水合酶，即使在未達1000ppm(例如：未達10ppm)之雜質存在下仍可減小由於雜質所致對於使用脞水合酶之醯胺化合物生成反應之抑制。

【0117】

如表10所示，可知對於來自野生型嗜熱假諾卡氏菌之脞水合酶進行了屬於前述(i)、以及由(g)、(l)及(m)構成之群組之胺基酸殘基取代之各實施例之變異型脞水合酶，即使在比室溫(20°C)高之溫度30°C之反應條件下，酵素活性仍不降低，以良好效率生成醯胺化合物。即，可知對於來自野生型嗜熱假諾卡氏菌之脞水合酶實施了屬於前述(i)、以及由(g)、(l)及(m)構成之群組之胺基酸殘基取代之各實施例之變異型脞水合酶，耐熱性優異。

【0118】

日本特願2022-106069號之揭示其全體納入本說明書作為參照。本說明書記載之全部文獻、專利申請案、及技術規格，和各文獻、專利申請案、及技術規格具體且個別記載時為同程度地在本說明書中援用作為參照。

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing dtdVersion="V1_3" fileName="P16608_序列表MT-F03462-00(發明名稱及申請人中譯).xml" softwareName="WIPO Sequence" softwareVersion="2.3.0"
productionDate="2023-06-30">
  <ApplicantFileReference>2023P00230</ApplicantFileReference>
  <EarliestPriorityApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>JP</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>2022-106069</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2022-06-30</FilingDate>
  </EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <ApplicantName languageCode="zh">三井化學股份有限公司</ApplicantName>
  <ApplicantNameLatin>MITSUI CHEMICALS, INC.</ApplicantNameLatin>
  <InventionTitle languageCode="zh">變異型脛水合酶、編碼該變異型脛水合酶之核酸、含有該核酸之載體及轉形體、該變異型脛水合酶之製造方法、及醯胺化合物之製造方法</InventionTitle>
  <SequenceTotalQuantity>36</SequenceTotalQuantity>
  <SequenceData sequenceIDNumber="1">
    <INSDSeq>
      <INSDSeq_length>205</INSDSeq_length>
      <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
      <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
      <INSDSeq_feature-table>
        <INSDFeature>
          <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
          <INSDFeature_location>1..205</INSDFeature_location>
          <INSDFeature_qual>
            <INSDQualifier>
              <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
            <INSDQualifier id="q1">
              <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>Pseudonocardia thermophila</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
          </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
      </INSDSeq_feature-table>
```

```
<INSDSeq_sequence>MTENILRKSDEEIQKEITARVKALESMLIEQGI LTTSMIDRMAE IYENEVGPLGAKVVVKA
WTDPEFKKRL LADGTEACKELGIGGLQGEDMMWVENTDEVHVVVCTLCSCYPWPV LGLPPNWFKEPQYRSRVVREPRQL
LKEEFGFEVPPSKEIKVWDSSEMRFVLPQRPAGTDGWSEEELATLV TRESMIGVEPAKAVA</INSDSeq_sequenc
e>
```

```
</INSDSeq>
```

```
</SequenceData>
```

```
<SequenceData sequenceIDNumber=" 2" >
```

```
<INSDSeq>
```

```
<INSDSeq_length>233</INSDSeq_length>
```

```
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
```

```
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

```
<INSDSeq_feature-table>
```

```
<INSDFeature>
```

```
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
```

```
<INSDFeature_location>1..233</INSDFeature_location>
```

```
<INSDFeature_qual>
```

```
<INSDQualifier>
```

```
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
```

```
</INSDQualifier>
```

```
<INSDQualifier id="q2">
```

```
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
<INSDQualifier_value>Pseudonocardia thermophila</INSDQualifier_value>
```

```
</INSDQualifier>
```

```
</INSDFeature_qual>
```

```
</INSDFeature>
```

```
</INSDSeq_feature-table>
```

```
<INSDSeq_sequence>MNGVYDVG GTDGLGPI NRPADEPVFRAWEK VAFAMFPATFRAGFMGLDEF RFGIEQMNP AE
YLESPYYWHWIRTYIHHGVRTGKIDLEELERRTQYYRENPDAPLPEHEQKPELIEFVNQAVYGGLPASREVD RPPKFKEG
DVVRFSTASPKGHARRARYVRGKTGT VVKHHGAYIYPDTAGNGLGECPEHLYTVRFTAQELWGPEGDPNSSVYYDCWEPY
IELVDTKAAAA</INSDSeq_sequence>
```

```
</INSDSeq>
```

```
</SequenceData>
```

```
<SequenceData sequenceIDNumber=" 3" >
```

```
<INSDSeq>
```

```
<INSDSeq_length>618</INSDSeq_length>
```

```
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
```

```
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

```
<INSDSeq_feature-table>
```

```

<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..618</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>genomic DNA</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q3">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Pseudonocardia thermophila</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgaccgagaacatcctgCGCAAGTCGGACGAGGAGATCCAGAAGGAGATCACGGCGCGGGT
caaggccctggagtcgatgctcatcgaacagggcatcctcaccacgtcgatgatcgaccggatggccgagatctacgaga
acgaggtcggcccgacctcggcgcgaaggtcgtcgtgaaggcctggaccgacccggagttcaagaagcgtctgctgcc
gacggcaccgaggcctgcaaggagctcggcatcggcggcctgcagggcgaggacatgatgtgggtggagaacaccgacga
ggtccaccacgtcgtcgtgtgcacgctctgctcctgctaccctggccggtgctggggctgccgccgaactggttcaagg
agccgcagtaccgctcccgcgtggtgcgtgagccccggcagctgctcaaggaggagttcggcttcgaggtcccgccgagc
aaggagatcaaggtctgggactccagctccgagatgcgcttcgtcgtcctcccgcagcgcggggcaccgacgggtg
gagcgaggaggagctgccaccctcgtcaccgcgagtcgatgatcggcgtcgaaccggcgaaggcggtcgcgtga</IN
SDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="4">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>702</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..702</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>genomic DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q4">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>Pseudonocardia thermophila</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgaacggcgtgtacgacgtcggcggcaccgatgggctgggcccgatcaaccggcccgcgga
cgaaccggctcttccgcgccgagtgggagaaggtcgcgttcgcgatgttcccggcgacgttccgggcccggcttcatgggccc
tgacgagttccggttcggcatcgagcagatgaaccggccgagtacctcgagtcgccgtactactggcactggatccgc
acctacatccaccacggcgtccgcaccggcaagatcgatctcgaggagctggagcgcgccacgcagtactaccggggagaa
ccccgacgccccgctgcccgagcacgagcagaagccggagttgatcgagttcgtcaaccaggccgtctacggcgggctgc
ccgcaagccgggaggtcgaccgaccgccaagtccaaggaggggcgacgtgggtgcggttctccaccgcgagcccgaagggc
cacgcccggcgcgcggttacgtgcgcggcaagaccgggacggtggtcaagcaccacggcgcgtacatctaccgggacac
cgccggcaacggcctgggagtgccccgagcacctctacaccgtccgcttcacggcccaggagctgtggggggccggaag
gggaccgaactccagcgtctactacgactgctgggagccctacatcgagctcgtcgacacgaaggcggcccgcggcatga
</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="5">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>33</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q5">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Primer</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>

```

```
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q6">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>acgggtcgggtcaagggcctggagtcgatgctc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="6">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>33</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q7">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Primer</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```

    <INSDQualifier id="q8">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gacgaggtccaccacatggtcgtgtgcacgctc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="7">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>33</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q9">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Primer</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q10">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>cgtgagccccggcagtcctcaaggaggagttc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 8" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>33</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q11">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Primer</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q12">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>cggcagctgctcaaggacgagttcggcttcgag</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```

<SequenceData sequenceIDNumber=" 9" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>33</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q13">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Primer</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q14">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>ttcggcttcgaggtcgggccgagcaaggagatc</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 10" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>33</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>

```

```

<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier id="q15">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Primer</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q16">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ggcttcgaggtcccgcgcagcaaggagatcaag</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="11">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>33</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>

```

```
<INSDQualifier id="q17">
  <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>Primer</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q18">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>cccgcgggcaccgacgtgtggagcgaggaggag</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="12">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>33</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q19">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Primer</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q20">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ggcaagatcgatctcctcgagctggagcgccgc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="13">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>33</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q21">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Primer</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
```

```

<INSDQualifier>
  <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q22">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gagttcgtcaaccagatagtctacggcgggctg</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="14">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>33</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q23">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Primer</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q24">

```

```

    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gtggtgcggttctcccaagcgagcccgaagggc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="15">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>33</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q25">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Primer</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q26">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>tccaccgcgagcccgcggtggccacgcccggcgc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="16">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>33</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier id="q27">
<INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Primer</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q28">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>aacggcctgggcgagtcaccccgagcacctctac</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="17">

```

```

<INSDSeq>
  <INSDSeq_length>33</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier id="q29">
          <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>Primer</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
      </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>
          <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="q30">
          <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
      </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>gagctgtgggtgccgggggggacccgaactac</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="18">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>33</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>

```

```

<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q31">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Primer</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q32">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gacactaaggaggtctgggcatgaccgagaaca</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="19">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>33</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q33">

```

```

    <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Primer</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q34">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>actaaggaggtcgcgagatgaccgagaacatca</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="20">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>33</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q35">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Primer</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q36">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gaggaggagctcgccaaactcgtcactcgcgag</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="21">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>33</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q37">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Primer</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
```

```

    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q38">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ttcatgggcgtggacgggttccggttcggcatc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="22">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>33</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q39">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Primer</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="q40">
          <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>

```

```

    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>cactggatccgcacctgcatccacaacggcgctc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="23" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>33</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q41">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Primer</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q42">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>

```

```
<INSDSeq_sequence>gtgcgtgagccccggcgactgctcaaggaggag</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="24">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>33</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q43">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Primer</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q44">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>tccatgggcgtggacgggttccggttcggcatc</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="25">
  <INSDSeq>
```

```
<INSDSeq_length>33</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier id="q45">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Primer</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q46">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gacgaggtccaccacatggtcgtgtgcacgctc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="26">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>33</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
```

```

<INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier id="q47">
    <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Primer</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q48">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ggttgagcgaggaggcactcgccaccctcgtc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="27">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>33</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q49">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>

```

```

    <INSDQualifier_value>Primer</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q50">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gagggcgacgtggtgcagttctccaccgcgagc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="28">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>33</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q51">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Primer</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q52">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>cagccccggcgcgcgcaatacgtgcgcggaag</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="29">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>33</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q53">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Primer</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

```

```

    <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q54">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>aagcaccacggcgcgtgcatctacccggacacc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="30">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>33</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q55">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Primer</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q56">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>cacaacggcgtccgccacggcaagatcgatctc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 31" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>33</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q57">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Primer</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q58">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>cccgaagccgggagcgcgaccgaccgcccaag</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 32" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>33</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q59">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Primer</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q60">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>accggcaagatcgatcgggaggagctggagcgc</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 33" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>

```

```

<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier id="q61">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Primer</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q62">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gttttcccagtcacgac</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="34">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>

```

```
<INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier id="q63">
    <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Primer</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q64">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ggccagtgccctagcttacat</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="35">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q65">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Primer</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```

    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q66">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>caggaaacagctatgac</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="36">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>144</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..144</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q67">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Pseudonocardia thermophila</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

```

```
<INSDFeature_location>1..144</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q68">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MSAEAKVRLKHCPTAEDRAAADALLAQLPGGDRALDRGFDEPWQLRAFALAVAACRAGRFEW
KQLQQALISSIGEWERTHLDLDDPSWSYYEHFVAALESVLGEEGIVEPEALDERTAEVLANPPNKDHHGPHLEPVAVHPAV
RS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種變異型脲水合酶，係具有和序列編號1表示之胺基酸序列為90%以上之序列同一性之 α 次單元及和序列編號2表示之胺基酸序列為90%以上之序列同一性之 β 次單元之脲水合酶，其中，

包含選自由下列(a)~(q)構成之群組中之至少1個胺基酸殘基之取代：

(a) α 次單元中，序列編號1之N末端起第23位對應之胺基酸殘基Ala取代為Gly，

(b) α 次單元中，序列編號1之N末端起第105位對應之胺基酸殘基Val取代為Met，

(c) α 次單元中，序列編號1之N末端起第142位對應之胺基酸殘基Leu取代為Cys，

(d) α 次單元中，序列編號1之N末端起第145位對應之胺基酸殘基Glu取代為Asp，

(e) α 次單元中，序列編號1之N末端起第152位對應之胺基酸殘基Pro取代為Gly，

(f) α 次單元中，序列編號1之N末端起第153位對應之胺基酸殘基Pro取代為Arg或Val，

(g) α 次單元中，序列編號1之N末端起第180位對應之胺基酸殘基Gly取代為Val，

(h) β 次單元中，序列編號2之N末端起第89位對應之胺基酸殘基Glu取代為Leu，

(i) β 次單元中，序列編號2之N末端起第122位對應之胺基酸殘基Ala取代為Ile、Leu或Thr，

(j) β 次單元中，序列編號2之N末端起第149位對應之胺基酸殘基Thr取代為Gln，

(k) β 次單元中，序列編號2之N末端起第153位對應之胺基酸殘基Lys取代為Val、Arg或Pro，

(l) β 次單元中，序列編號2之N末端起第189位對應之胺基酸殘基Cys取代為Ser，

(m) β 次單元中，序列編號2之N末端起第207位對應之胺基酸殘基Glu取代為Pro、Ser或Gly，

(n) β 次單元中，序列編號2之N末端起第232位對應之胺基酸殘基Ala取代為Trp、Ser、Pro、Phe、Ile、Arg、Cys或Gly，

(o) β 次單元中，序列編號2之N末端起第233位對應之胺基酸殘基Ala取代為Glu或Gln，

(p) α 次單元中，序列編號1之N末端起第188位對應之胺基酸殘基Thr取代為Lys，

(q) β 次單元中，序列編號2之N末端起第50位對應之胺基酸殘基Glu取代為Gly。

【請求項2】

如請求項1之變異型脛水合酶，包含選自由該(a)~該(q)構成之群組中之至少2個胺基酸殘基取代。

【請求項3】

如請求項1或2之變異型脛水合酶，包含選自由該(i)、(g)、(j)、及(n)構成之群組中之至少1個胺基酸殘基取代。

【請求項4】

如請求項1或2之變異型脞水合酶，包含選自由該(i)、(g)、(l)、及(m)構成之群組中之至少1個胺基酸殘基取代。

【請求項5】

如請求項1或2之變異型脞水合酶，包含選自由該(g)、(p)、及(q)構成之群組中之至少1個胺基酸殘基取代。

【請求項6】

如請求項1或2之變異型脞水合酶，其中，該 α 次單元之胺基酸序列更包含選自由下列(A1)~(A6)構成之群組中之至少1個胺基酸殘基取代：

(A1) α 次單元中，序列編號1之N末端起第20位對應之胺基酸殘基Arg取代為Val，

(A2) α 次單元中，序列編號1之N末端起第141位對應之胺基酸殘基Gln取代為Arg，

(A3) α 次單元中，序列編號1之N末端起第185位對應之胺基酸殘基Glu取代為Ala，

(A4) α 次單元中，序列編號1之N末端起第187位對應之胺基酸殘基Ala取代為Arg，

(A5) α 次單元中，序列編號1之N末端起第200位對應之胺基酸殘基Pro取代為Ala，

(A6) α 次單元中，序列編號1之N末端起第204位對應之胺基酸殘基Val取代為Leu。

【請求項7】

如請求項1或2之變異型脞水合酶，其中，該 β 次單元之胺基酸序列更包含選自由下列(B1)~(B9)構成之群組中之至少1個胺基酸殘基取代：

(B1) β 次單元中，序列編號2之N末端起第40位對應之胺基酸殘基Thr取代為Ile，

(B2) β 次單元中，序列編號2之N末端起第42位對應之胺基酸殘基Arg取代為Pro，

(B3) β 次單元中，序列編號2之N末端起第76位對應之胺基酸殘基Thr取代為Cys，

(B4) β 次單元中，序列編號2之N末端起第83位對應之胺基酸殘基Thr取代為His，

(B5) β 次單元中，序列編號2之N末端起第88位對應之胺基酸殘基Leu取代為Arg、Pro或Ser，

(B6) β 次單元中，序列編號2之N末端起第146位對應之胺基酸殘基Arg取代為Gln或Thr，

(B7) β 次單元中，序列編號2之N末端起第160位對應之胺基酸殘基Arg取代為Gln或Ile，

(B8) β 次單元中，序列編號2之N末端起第108位對應之胺基酸殘基Glu取代為Arg，

(B9) β 次單元中，序列編號2之N末端起第176位對應之胺基酸殘基Tyr取代為Cys。

【請求項8】

一種核酸，編碼如請求項1或2之變異型脛水合酶。

【請求項9】

一種載體，含有如請求項8之核酸。

【請求項10】

如請求項9之載體，係表現載體。

【請求項11】

一種轉形體，含有如請求項10之表現載體。

【請求項12】

一種變異型脛水合酶之製造方法，包括下列步驟：

在培養基中培養如請求項11之轉形體；及

從培養的轉形體及培養基中之至少一者回收如請求項1或2之變異型脛水合酶。

【請求項13】

一種變異型脛水合酶，係利用如請求項12之變異型脛水合酶之製造方法獲得。

【請求項14】

一種醯胺化合物之製造方法，包括使如請求項1或2之變異型脛水合酶接觸脛化合物之步驟。