

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-194588

(P2004-194588A)

(43) 公開日 平成16年7月15日(2004.7.15)

(51) Int.Cl.⁷

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/10

F I

C 1 2 N 15/00

Z N A A

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 9/88

テーマコード (参考)

4 B O 2 4

4 B O 5 0

4 B O 6 4

4 B O 6 5

審査請求 未請求 請求項の数 55 O L (全 148 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-368360 (P2002-368360)

(22) 出願日 平成14年12月19日 (2002.12.19)

(71) 出願人 000005887

三井化学株式会社

東京都港区東新橋一丁目5番2号

(74) 代理人 100088328

弁理士 金田 暢之

(74) 代理人 100106297

弁理士 伊藤 克博

(74) 代理人 100106138

弁理士 石橋 政幸

(72) 発明者 八巻 俊文

千葉県茂原市東郷1144 三井化学株式会社内

(72) 発明者 的 石 かおり

千葉県茂原市東郷1144 三井化学株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規なニトリルヒドラーゼ

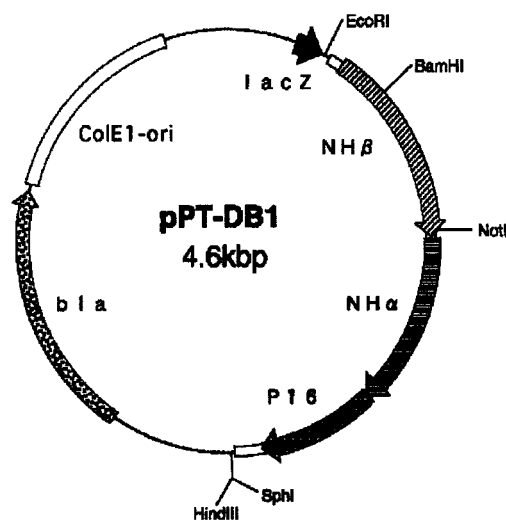
(57) 【要約】

【課題】 新規な変異点を有するニトリルヒドラーゼのアミノ酸配列及び該遺伝子の塩基配列を提供する。

【解決手段】 シュードノカルディア・サーモフィラ *Pseudonocardia thermophila* JC M3095由来であり、ヘテロな2種のサブユニットから構成されるニトリルヒドラーゼに新規な変異を導入し、得られる変異体のアミノ酸配列及び該遺伝子の塩基配列を提供する。また、該遺伝子が挿入されたプラスミドを作製し、該プラスミドを導入した形質転換体を、ニトリル化合物を対応するアミド化合物に変換する触媒として用いる。

【効果】 ニトリル化合物を対応するアミド化合物に効率良く変換することが可能となる。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サブユニットと サブユニットとを有するニトリルヒドラーゼにおいて、
前記 サブユニットが、配列表の配列番号：1 のアミノ酸配列の 36 番目、71 番目、148 番目及び 204 番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列を有することを特徴とするニトリルヒドラーゼ。

【請求項 2】

前記 サブユニットのアミノ酸配列の 6 番目、19 番目、38 番目、77 番目、90 番目、102 番目、106 番目、126 番目、130 番目、142 番目、146 番目、187 番目、194 番目及び 203 番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に更に置換されている請求項 1 に記載のニトリルヒドラーゼ。 10

【請求項 3】

前記 サブユニットが配列表の配列番号：2 のアミノ酸配列を有する請求項 1 または 2 に記載のニトリルヒドラーゼ。

【請求項 4】

前記 サブユニットのアミノ酸配列の 10 番目、32 番目、37 番目、41 番目、46 番目、48 番目、51 番目、72 番目、118 番目、127 番目、146 番目、160 番目、186 番目及び 217 番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸にさらに置換されている請求項 3 に記載のニトリルヒドラーゼ。

【請求項 5】

前記 サブユニットのアミノ酸配列の 20 番目、21 番目、108 番目、200 番目及び 212 番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に更に置換されている請求項 4 に記載のニトリルヒドラーゼ。 20

【請求項 6】

前記 サブユニット及び前記 サブユニットの少なくとも一方の有する前記アミノ酸配列の前記アミノ酸置換位置以外の位置において 1 個または数個のアミノ酸が、ニトリルヒドラーゼ活性が損なわれない範囲で置換、挿入または削除されている請求項 1～5 に記載のニトリルヒドラーゼ。

【請求項 7】

サブユニットと サブユニットとを有するニトリルヒドラーゼにおいて、
サブユニットが、配列表の配列番号：2 のアミノ酸配列の 10 番目、32 番目、37 番目、41 番目、46 番目、48 番目、51 番目、72 番目、118 番目、127 番目、146 番目、160 番目、186 番目及び 217 番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列を有することを特徴とするニトリルヒドラーゼ。 30

【請求項 8】

前記 サブユニットのアミノ酸配列の 20 番目、21 番目、108 番目、200 番目及び 212 番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に更に置換されている請求項 7 に記載のニトリルヒドラーゼ。

【請求項 9】

前記 サブユニットが、配列表の配列番号：1 のアミノ酸配列を有する請求項 7 または 8 に記載のニトリルヒドラーゼ。 40

【請求項 10】

前記 サブユニットの 36 番目、71 番目、148 番目及び 204 番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている請求項 9 に記載のニトリルヒドラーゼ。

【請求項 11】

前記 サブユニットのアミノ酸配列の 6 番目、19 番目、38 番目、77 番目、90 番目、102 番目、106 番目、126 番目、130 番目、142 番目、146 番目、187 番目、194 番目及び 203 番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸 50

に更に置換されている請求項 10 に記載のニトリルヒドラーゼ。

【請求項 12】

前記 サブユニット及び前記 サブユニットの少なくとも一方有する前記アミノ酸配列の前記アミノ酸置換位置以外の位置において、1 個または数個のアミノ酸が、ニトリルヒドラーゼ活性が損なわれない範囲で置換、挿入または削除されている請求項 7 ~ 11 に記載のニトリルヒドラーゼ。

【請求項 13】

ニトリルヒドラーゼの サブユニットのアミノ酸配列をコードする遺伝子において、前記アミノ酸配列が、配列表の配列番号：1 のアミノ酸配列の 36 番目、71 番目、148 番目及び 204 番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列であることを特徴とする遺伝子。 10

【請求項 14】

前記アミノ酸配列の 6 番目、19 番目、38 番目、77 番目、90 番目、102 番目、106 番目、126 番目、130 番目、142 番目、146 番目、187 番目、194 番目及び 203 番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に更に置換されている請求項 13 に記載の遺伝子。

【請求項 15】

前記 サブユニットのアミノ酸配列の有する前記アミノ酸置換位置以外の位置において、1 個または数個のアミノ酸が、ニトリルヒドラーゼ活性が損なわれない範囲で置換、挿入または削除されている請求項 13 または 14 に記載の遺伝子。 20

【請求項 16】

配列表の配列番号：3 の塩基配列の 106 番目から 108 番目、211 番目から 213 番目、442 番目から 444 番目及び 610 番目から 612 番目の何れか一つ以上の塩基配列を他の塩基配列に置換して得られる塩基配列を有する請求項 13 に記載の遺伝子。

【請求項 17】

前記塩基配列の 16 番目から 18 番目、55 番目から 57 番目、112 番目から 114 番目、229 番目から 231 番目、268 番目から 270 番目、304 番目から 306 番目、316 番目から 318 番目、376 番目から 378 番目、388 番目から 390 番目、424 番目から 426 番目、436 番目から 438 番目、559 番目から 561 番目、580 番目から 582 番目及び 607 番目から 609 番目の何れか一つ以上の塩基配列が他の塩基配列にさらに置換されている請求項 16 に記載の遺伝子。 30

【請求項 18】

ニトリルヒドラーゼの サブユニットのアミノ酸配列をコードする遺伝子において、前記アミノ酸配列が、配列表の配列番号：2 のアミノ酸配列の 10 番目、32 番目、37 番目、41 番目、46 番目、48 番目、51 番目、72 番目、118 番目、127 番目、146 番目、160 番目、186 番目及び 217 番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列である遺伝子。

【請求項 19】

前記アミノ酸配列の 20 番目、21 番目、108 番目、200 番目及び 212 番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に更に置換されている請求項 18 に記載の遺伝子。 40

【請求項 20】

前記 サブユニットのアミノ酸配列の有する前記アミノ酸置換位置以外の位置において、1 個または数個のアミノ酸が、ニトリルヒドラーゼ活性が損なわれない範囲で置換、挿入または削除されている請求項 18 または 19 に記載の遺伝子。

【請求項 21】

配列表の配列番号：4 に記載の塩基配列の 28 番目から 30 番目、94 番目から 96 番目、109 番目から 111 番目、121 番目から 123 番目、136 番目から 138 番目、142 番目から 144 番目、151 番目から 153 番目、214 番目から 216 番目、352 番目から 354 番目、379 番目から 381 番目、436 番目から 438 番目、478 50

番目から 4 8 0 番目、5 5 6 番目から 5 5 8 番目及び 6 4 9 番目から 6 5 1 番目の何れか一つ以上の塩基配列を他の塩基配列に置換して得られる塩基配列を有する請求項 1 8 に記載の遺伝子。

【請求項 2 2】

前記塩基配列の 5 8 番目から 6 0 番目、6 1 番目から 6 3 番目、3 2 2 番目から 3 2 4 番目、5 9 8 番目から 6 0 0 番目及び 6 3 4 番目から 6 3 6 番目の何れか一つ以上の塩基配列が他の塩基配列に更に置換されている請求項 2 1 に記載の遺伝子。

【請求項 2 3】

ニトリルヒドラーゼの サブユニットのアミノ酸配列をコードする遺伝子と サブユニットのアミノ酸配列をコードする遺伝子とを有するニトリルヒドラーゼをコードする遺伝子において、

前記 サブユニットのアミノ酸配列が、配列表の配列番号：1 のアミノ酸配列の 3 6 番目、7 1 番目、1 4 8 番目及び 2 0 4 番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列であることを特徴とする遺伝子。

【請求項 2 4】

前記 サブユニットのアミノ酸配列の 6 番目、1 9 番目、3 8 番目、7 7 番目、9 0 番目、1 0 2 番目、1 0 6 番目、1 2 6 番目、1 3 0 番目、1 4 2 番目、1 4 6 番目、1 8 7 番目、1 9 4 番目及び 2 0 3 番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に更に置換されている請求項 2 3 に記載の遺伝子。

【請求項 2 5】

前記 サブユニットのアミノ酸配列の有する前記アミノ酸置換位置以外の位置において、1 個または数個のアミノ酸が、ニトリルヒドラーゼ活性が損なわれない範囲で置換、挿入または削除されている請求項 2 3 または 2 4 に記載の遺伝子。

【請求項 2 6】

前記 サブユニットのアミノ酸配列をコードする遺伝子が、配列表の配列番号：3 の塩基配列の 1 0 6 番目から 1 0 8 番目、2 1 1 番目から 2 1 3 番目、4 4 2 番目から 4 4 4 番目及び 6 1 0 番目から 6 1 2 番目の何れか一つ以上の塩基配列を他の塩基配列に置換して得られる塩基配列を有する請求項 2 3 に記載の遺伝子。

【請求項 2 7】

前記塩基配列の 1 6 番目から 1 8 番目、5 5 番目から 5 7 番目、1 1 2 番目から 1 1 4 番目、2 2 9 番目から 2 3 1 番目、2 6 8 番目から 2 7 0 番目、3 0 4 番目から 3 0 6 番目、3 1 6 番目から 3 1 8 番目、3 7 6 番目から 3 7 8 番目、3 8 8 番目から 3 9 0 番目、4 2 4 番目から 4 2 6 番目、4 3 6 番目から 4 3 8 番目、5 5 9 番目から 5 6 1 番目、5 8 0 番目から 5 8 2 番目及び 6 0 7 番目から 6 0 9 番目の何れか一つ以上の塩基配列が他の塩基配列にさらに置換されている請求項 2 6 に記載の遺伝子。

【請求項 2 8】

前記 サブユニットのアミノ酸配列が配列表の配列番号：2 のアミノ酸配列である請求項 2 3 ~ 2 7 のいずれかに記載の遺伝子。

【請求項 2 9】

前記 サブユニットのアミノ酸配列が、前記配列番号：2 のアミノ酸配列の 1 0 番目、3 2 番目、3 7 番目、4 1 番目、4 6 番目、4 8 番目、5 1 番目、7 2 番目、1 1 8 番目、1 2 7 番目、1 4 6 番目、1 6 0 番目、1 8 6 番目及び 2 1 7 番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列である請求項 2 3 ~ 2 7 のいずれかに記載の遺伝子。

【請求項 3 0】

前記 サブユニットのアミノ酸配列の 2 0 番目、2 1 番目、1 0 8 番目、2 0 0 番目及び 2 1 2 番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に更に置換されている請求項 2 9 に記載の遺伝子。

【請求項 3 1】

前記 サブユニットのアミノ酸配列の有する前記アミノ酸置換位置以外の位置において、

1 個または数個のアミノ酸が、ニトリルヒドラーゼ活性が損なわれない範囲で置換、挿入または削除されている請求項 29 または 30 に記載の遺伝子。

【請求項 32】

前記 サブユニットのアミノ酸配列をコードする遺伝子が、配列表の配列番号：4 の塩基配列を有する請求項 28 に記載の遺伝子。

【請求項 33】

前記 サブユニットのアミノ酸配列をコードする遺伝子が、配列表の配列番号：4 記載の塩基配列の 28 番目から 30 番目、94 番目から 96 番目、109 番目から 111 番目、121 番目から 123 番目、136 番目から 138 番目、142 番目から 144 番目、151 番目から 153 番目、214 番目から 216 番目、352 番目から 354 番目、379 番目から 381 番目、436 番目から 438 番目、478 番目から 480 番目、556 番目から 558 番目及び 649 番目から 651 番目の何れか一つ以上の塩基配列を他の塩基配列に置換して得られる塩基配列を有する請求項 29 に記載の遺伝子。

10

【請求項 34】

前記塩基配列の 58 番目から 60 番目、61 番目から 63 番目、322 番目から 324 番目、598 番目から 600 番目及び 634 番目から 636 番目の何れか一つ以上の塩基配列が他の塩基配列に更に置換されている請求項 33 に記載の遺伝子。

【請求項 35】

ニトリルヒドラーゼの サブユニットのアミノ酸配列をコードする遺伝子と サブユニットのアミノ酸配列をコードする遺伝子とを有するニトリルヒドラーゼをコードする遺伝子において、

20

前記 サブユニットのアミノ酸配列が、配列表の配列番号：2 のアミノ酸配列の 10 番目、32 番目、37 番目、41 番目、46 番目、48 番目、51 番目、72 番目、118 番目、127 番目、146 番目、160 番目、186 番目及び 217 番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列であることを特徴とする遺伝子。

【請求項 36】

前記アミノ酸配列の 20 番目、21 番目、108 番目、200 番目及び 212 番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に更に置換されている請求項 35 に記載の遺伝子。

30

【請求項 37】

前記 サブユニットのアミノ酸配列の有する前記アミノ酸置換位置以外の位置において、1 個または数個のアミノ酸が、ニトリルヒドラーゼ活性が損なわれない範囲で置換、挿入または削除されている請求項 35 または 36 に記載の遺伝子。

【請求項 38】

前記 サブユニットのアミノ酸配列をコードする塩基配列が、配列表の配列番号：4 記載の塩基配列の 28 番目から 30 番目、94 番目から 96 番目、109 番目から 111 番目、121 番目から 123 番目、136 番目から 138 番目、142 番目から 144 番目、151 番目から 153 番目、214 番目から 216 番目、352 番目から 354 番目、379 番目から 381 番目、436 番目から 438 番目、478 番目から 480 番目、556 番目から 558 番目及び 649 番目から 651 番目の何れか一つ以上の塩基配列を他の塩基配列に置換して得られる塩基配列を有する請求項 35 に記載の遺伝子。

40

【請求項 39】

前記塩基配列の 58 番目から 60 番目、61 番目から 63 番目、322 番目から 324 番目、598 番目から 600 番目及び 634 番目から 636 番目の何れか一つ以上の塩基配列が他の塩基配列に更に置換されている請求項 38 に記載の遺伝子。

【請求項 40】

前記 サブユニットのアミノ酸配列が、配列表の配列番号：1 のアミノ酸配列を有する請求項 35 ~ 39 のいずれかに記載の遺伝子。

【請求項 41】

50

前記 サブユニットのアミノ酸配列が、配列表の配列番号：１のアミノ酸配列の３６番目、７１番目、１４８番目及び２０４番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列である請求項３５～３９のいずれかに記載の遺伝子。

【請求項４２】

前記 サブユニットのアミノ酸配列の６番目、１９番目、３８番目、７７番目、９０番目、１０２番目、１０６番目、１２６番目、１３０番目、１４２番目、１４６番目、１８７番目、１９４番目及び２０３番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に更に置換されている請求項４１に記載の遺伝子。

【請求項４３】

前記 サブユニットのアミノ酸配列の有する前記アミノ酸置換位置以外の位置において、１個または数個のアミノ酸が、ニトリルヒドラーゼ活性が損なわれない範囲で置換、挿入または削除されている請求項４１または４２に記載の遺伝子。 10

【請求項４４】

前記 サブユニットのアミノ酸配列をコードする遺伝子が、配列表の配列番号：３の塩基配列を有する請求項４０に記載の遺伝子。

【請求項４５】

前記 サブユニットのアミノ酸配列をコードする遺伝子が、配列表の配列番号：３の塩基配列の１０６番目から１０８番目、２１１番目から２１３番目、４４２番目から４４４番目及び６１０番目から６１２番目の何れか一つ以上の塩基配列を他の塩基配列に置換して得られる塩基配列を有する請求項４１に記載の遺伝子。 20

【請求項４６】

前記塩基配列の１６番目から１８番目、５５番目から５７番目、１１２番目から１１４番目、２２９番目から２３１番目、２６８番目から２７０番目、３０４番目から３０６番目、３１６番目から３１８番目、３７６番目から３７８番目、３８８番目から３９０番目、４２４番目から４２６番目、４３６番目から４３８番目、５５９番目から５６１番目、５８０番目から５８２番目及び６０７番目から６０９番目の何れか一つ以上の塩基配列が他の塩基配列にさらに置換されている請求項４５に記載の遺伝子。

【請求項４７】

請求項１～１２のいずれかに記載のニトリルヒドラーゼをコードする遺伝子を有することを特徴とするプラスミド。 30

【請求項４８】

前記ニトリルヒドラーゼの サブユニットをコードする遺伝子が、配列番号：３の塩基配列または請求項１３～１６のいずれかに記載の遺伝子である請求項２１に記載のプラスミド。

【請求項４９】

前記ニトリルヒドラーゼの サブユニットをコードする遺伝子が、配列番号：４の塩基配列または請求項１７～１９のいずれかに記載の遺伝子である請求項２１または２２に記載のプラスミド。

【請求項５０】

請求項２３～４６のいずれかに記載のニトリルヒドラーゼをコードする遺伝子を有することを特徴とするプラスミド。 40

【請求項５１】

前記ニトリルヒドラーゼの宿主細胞での発現のための構成を有する請求項４７～５０のいずれかに記載のプラスミド。

【請求項５２】

請求項５１に記載のプラスミドによって宿主細胞を形質転換して得られた形質転換体。

【請求項５３】

ニトリルヒドラーゼの生産方法において、
請求項５２に記載の形質転換体を培地で培養して、該形質転換体に前記プラスミドの有するニトリルヒドラーゼ遺伝子に基づくニトリルヒドラーゼを生産させる工程を有する 50

ことを特徴とする生産方法。

【請求項 54】

前記培養後の形質転換体、培養液及びそれらの処理物からニトリルヒドラーゼを回収する工程を更に有する請求項 53 に記載の生産方法。

【請求項 55】

ニトリル化合物を水性媒体中でニトリルヒドラーゼを接触させて対応するニトリル化合物を得るニトリル化合物の製造方法において、

前記ニトリルヒドラーゼが請求項 1 ～ 12 のいずれかに記載のものである

ことを特徴とする製造方法。

【発明の詳細な説明】

10

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規なニトリルヒドラーゼ及びそれをコードする遺伝子、該遺伝子を含有するプラスミド、該プラスミドにより形質転換された細胞株、該細胞株を用いてニトリルヒドラーゼを産生する方法、及び該細胞株を培養して得られる培養液・細胞・細胞処理物を用いてニトリル化合物から対応するアミド化合物を製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、種々の化合物のニトリル基を水和によりアミド基に変換するニトリル水和活性を有する酵素であるニトリルヒドラーゼが発見され、該酵素を産生する微生物株が多数開示されている。ニトリルヒドラーゼを用いてニトリル化合物よりアミド化合物を工業的に製造するためには、アミド化合物の製造コストに占める該酵素の製造コストを下げる必要である。より具体的には、酵素調製物の単位重量あたりの該酵素含有量を高くすることが重要である。そこで、該酵素の遺伝子を用いて遺伝子工学の手法により該酵素を大量に発現させることを目的として、該酵素の遺伝子をクローニングする試みが為されている。

20

【0003】

ニトリルヒドラーゼ活性を有する微生物としては、シュードノカルディア・サーモフィラ（本菌株は、理化学研究所微生物系統保存施設（埼玉県和光市広沢 2 - 1）に番号 JCM 3095 として保管され、何人にも請求により自由に分譲される。）が見い出されている（特許文献 1 参照）。

30

【0004】

また、同株よりニトリルヒドラーゼが単離され、同酵素が サブユニット及び サブユニットより構成されることが確認されている。そして、同株よりニトリルヒドラーゼ遺伝子が単離され、そのアミノ酸配列及び塩基配列を明らかにされるとともに、同酵素の機能を実質的に変化させない置換変異部位を有するニトリルヒドラーゼが見い出された。さらに、このニトリルヒドラーゼを形質転換体内で大量に発現できるプラスミド及び同プラスミドにより形質転換された細胞株（一例として MT - 10822：ブタペスト条約に則って、受託番号 FERM BP - 5785 として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寄託されている。）が作出された。加えて、該細胞株による該ニトリルヒドラーゼの生産及び該細胞株若しくはそれより得られる該ニトリルヒドラーゼをニトリル化合物と接触させる事による対応するアミド化合物の製造が可能となっている（特許文献 2 参照）。

40

【0005】

しかし、ニトリルヒドラーゼの機能を実質的に変化させない置換変異部位が該公報に記載されているもの以外に存在するのか、存在するならばその置換変異部位は遺伝子配列上の何処に相当する部位であるかに関しては未だ明らかとなっていなかった。

【0006】

【特許文献 1】

特開平 8 - 56684 号公報

【特許文献 2】

50

特開平 9 - 2 7 5 9 7 8 号公報

【特許文献 3】

特開平 1 1 - 2 5 3 1 6 8 号公報

なお、ニトリルヒドラーゼをコードする遺伝子を宿主細胞で発現させて酵素活性のあるニトリルヒドラーゼを生産する場合にこの酵素の活性化に關与するタンパク質が存在する点が特許文献 3 に開示されている。

【0 0 0 7】

【發明が解決しようとする課題】

本發明の目的は、機能を実質的に変化させない新規な置換変異部位を有するニトリルヒドラーゼのアミノ酸配列及び該遺伝子の塩基配列を提供する事である。さらに、該遺伝子を含むプラスミド、該プラスミドにより形質転換された細胞株、該細胞株を用いた該酵素の産生方法、及び該細胞株を培養して得られる培養液・細胞・細胞処理物を用いてニトリル化合物から対応するアミド化合物を製造する方法をも提供する事である。

10

【0 0 0 8】

【課題を解決するための手段】

本發明者らはかかる状況の下、特開平 9 - 2 7 5 9 7 8 号公報に開示されているニトリルヒドラーゼ遺伝子に、該公報には開示されていない新規な置換変異部位を導入し、該変異導入後の該遺伝子の塩基配列を決定した。さらに、該遺伝子を含むプラスミド、該プラスミドにより形質転換された細胞株を作製した。また、該細胞株を用いた該酵素の産生や該細胞株を培養して得られる培養液・細胞・細胞処理物を用いたニトリル化合物からの対応アミド化合物の製造に關しても鋭意検討を重ねた結果、本願發明を完成させるに至った。

20

【0 0 0 9】

本發明にかかるニトリルヒドラーゼのサブユニットは、配列番号：1 に示されるサブユニットのアミノ酸配列の 3 6 番目、7 1 番目、1 4 8 番目、及び 2 0 4 番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換した変異を有するアミノ酸配列を有することを特徴とする。

【0 0 1 0】

本發明にかかるニトリルヒドラーゼのサブユニットは、配列表の配列番号：2 に示すサブユニットのアミノ酸配列の 1 0 番目、3 2 番目、3 7 番目、4 1 番目、4 6 番目、4 8 番目、5 1 番目、7 2 番目、1 1 8 番目、1 2 7 番目、1 4 6 番目、1 6 0 番目、1 8 6 番目及び 2 1 7 番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換した変異を有するアミノ酸配列を有することを特徴とする。

30

【0 0 1 1】

本發明にかかるニトリルヒドラーゼは、サブユニットとサブユニットを有し、これらのサブユニットの少なくとも一方が上記の変異を有することを特徴とする。

【0 0 1 2】

本發明にかかるニトリルヒドラーゼのサブユニットをコードする遺伝子は、上記のサブユニットにおける変異を有するアミノ酸配列をコードすることを特徴とする。

【0 0 1 3】

本發明にかかるニトリルヒドラーゼのサブユニットをコードする遺伝子は、上記のサブユニットにおける変異を有するアミノ酸配列をコードすることを特徴とする。

40

【0 0 1 4】

本發明にかかるニトリルヒドラーゼをコードする遺伝子は、サブユニットをコードする遺伝子とサブユニットをコードする遺伝子とを有し、これらのサブユニットの少なくとも一方が上記の変異を有することを特徴とする。

【0 0 1 5】

本發明のプラスミドは、上記の遺伝子のいずれかを有することを特徴とする。

【0 0 1 6】

本發明の形質転換体は、上記のプラスミドを用いて宿主細胞を形質転換することに得られ

50

たものであることを特徴とする。

【0017】

本発明のニトリルヒドラターゼの製造は、上記の形質転換体、該形質転換体の培養液、または該形質転換体や該培養液の処理物からニトリルヒドラターゼを回収する工程を有することを特徴とする。

【0018】

本発明のアミド化合物の製造方法は、水性媒体中でニトリル化合物を上記のニトリルヒドラターゼとを接触させて該ニトリル化合物を対応するアミド化合物に変換する工程を有することを特徴とする。

【0019】

【発明の実施の形態】

以下、本発明について更に詳細に説明する。

【0020】

本発明のニトリルヒドラターゼは、シュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼに変異を導入して得られたものである。具体的には、配列表の配列番号：1及び2に示すアミノ酸配列の所定の部位の少なくとも1つ以上におけるアミノ酸を他のアミノ酸で置換したものにより基本的に構成される。

すなわち、本発明は、配列表の配列番号：1に示される205個のアミノ酸の配列により表されるサブユニットの内の少なくとも1個以上を他のアミノ酸で置換したものを構成要素とするニトリルヒドラターゼ、配列表の配列番号：2に示される233個のアミノ酸の配列により表されるサブユニットの構成アミノ酸計438個の内の少なくとも1個以上を他のアミノ酸で置換したものを構成要素とするニトリルヒドラターゼ及びその両方を構成要素とするニトリルヒドラターゼを含んでいる。

【0021】

本発明のニトリルヒドラターゼに用いられる具体的なアミノ酸配列には、以下のものが含まれる。

(a-0) 配列番号：1のサブユニットのアミノ酸配列

(a-1) 配列番号：1に示されるサブユニットのアミノ酸配列の36番目、71番目、148番目、及び204番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換した変異を有するアミノ酸配列

(a-2) 配列表の配列番号：1に示されるサブユニットのアミノ酸配列の6番目、19番目、38番目、77番目、90番目、102番目、106番目、126番目、130番目、142番目、146番目、187番目、194番目、及び203番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換した変異を有するアミノ酸配列

(b-0) 配列表の配列番号：2に示されるサブユニットのアミノ酸配列

(b-1) 配列表の配列番号：2に示すサブユニットのアミノ酸配列の10番目、32番目、37番目、41番目、46番目、48番目、51番目、72番目、118番目、127番目、146番目、160番目、186番目及び217番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換した変異を有するアミノ酸配列

(b-2) 配列表の配列番号：2に示すサブユニットのアミノ酸配列の20番目、21番目、108番目、200番目、及び212番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換した変異を有するアミノ酸配列

上記の各変異は、変異前のニトリルヒドラターゼ活性を少なくとも維持し得るものである。

【0022】

本発明のニトリルヒドラターゼは、上記の(a-0)～(b-2)から選択されたアミノ酸配列を有する以下の構成要素からなる。

(A-1) サブユニットが上記の(a-1)の変異を含むアミノ酸配列を有するニトリルヒドラターゼ

(A-2) サブユニットが上記の(a-1)及び(a-2)の変異を含むアミノ酸配

10

20

30

40

50

列を有するニトリルヒドラーゼ

(B - 1) サブユニットが上記の (b - 1) の変異を含むアミノ酸配列を有するニトリルヒドラーゼ

(B - 2) サブユニットが上記の (b - 1) 及び (b - 2) の変異を含むアミノ酸配列を有するニトリルヒドラーゼ

(A - 3) サブユニットが上記の (a - 1) の変異を含むアミノ酸配列を有し、サブユニットが上記の (b - 0) のアミノ酸配列を有するニトリルヒドラーゼ

(A - 4) サブユニットが上記の (a - 1) の変異を含むアミノ酸配列を有し、サブユニットが上記の (b - 1) の変異を含むアミノ酸配列を有するニトリルヒドラーゼ

(A - 5) サブユニットが上記の (a - 1) の変異を含むアミノ酸配列を有し、サブユニットが上記の (b - 2) の変異を含むアミノ酸配列を有するニトリルヒドラーゼ 10

(A - 6) サブユニットが上記の (a - 1) の変異を含むアミノ酸配列を有し、サブユニットが上記の (b - 1) 及び (b - 2) の変異を含むアミノ酸配列を有するニトリルヒドラーゼ

(A - 7) サブユニットが上記の (a - 1) 及び (a - 2) の変異を含むアミノ酸配列を有し、サブユニットが上記の (b - 0) のアミノ酸配列を有するニトリルヒドラーゼ

(A - 8) サブユニットが上記の (a - 1) 及び (a - 2) の変異を含むアミノ酸配列を有し、サブユニットが上記の (b - 1) の変異を含むアミノ酸配列を有するニトリルヒドラーゼ 20

(A - 9) サブユニットが上記の (a - 1) 及び (a - 2) の変異を含むアミノ酸配列を有し、サブユニットが上記の (b - 2) の変異を含むアミノ酸配列を有するニトリルヒドラーゼ

(A - 10) サブユニットが上記の (a - 1) 及び (a - 2) の変異を含むアミノ酸配列を有し、サブユニットが上記の (b - 1) 及び (b - 2) の変異を含むアミノ酸配列を有するニトリルヒドラーゼ

(B - 3) サブユニットが上記の (a - 0) のアミノ酸配列を有し、サブユニットが上記の (b - 1) のアミノ酸配列を有するニトリルヒドラーゼ

(B - 4) サブユニットが上記の (a - 0) のアミノ酸配列を有し、サブユニットが上記の (b - 1) 及び (b - 2) の変異を含むアミノ酸配列を有するニトリルヒドラーゼ 30

(B - 5) サブユニットが上記の (a - 2) の変異を含むアミノ酸配列を有し、サブユニットが上記の (b - 1) 及び (b - 2) の変異を含むアミノ酸配列を有するニトリルヒドラーゼ

なお、上記の特定された変異部位以外のアミノ酸については、上記の特定部位の変異による目的とするニトリルヒドラーゼ活性を損なわない範囲内で、アミノ酸の置換、挿入、欠失が生じてよい。

【0023】

本発明においてニトリルヒドラーゼ遺伝子には、ニトリルヒドラーゼのサブユニットをコードする遺伝子及びニトリルヒドラーゼのサブユニットをコードする遺伝子が含まれる。 40

【0024】

本発明にかかる遺伝子は、シュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラーゼ遺伝子に変異導入を施したものであり、これには、サブユニットのアミノ酸配列をコードする遺伝子；サブユニットをコードする遺伝子；及びサブユニットをコードする遺伝子とサブユニットをコードする遺伝子の両方を有するニトリルヒドラーゼ遺伝子が含まれる。

【0025】

具体的には、以下のものを挙げることができる。

(G - 1) 先に挙げた (a - 1) の変異を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を 50

有する遺伝子；

(G - 2) 先に挙げた (a - 1) 及び (a - 2) の変異を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子；

(G - 3) 先に挙げた (b - 1) の変異を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子；

(G - 4) 先に挙げた (b - 1) 及び (b - 2) の変異を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子；及び

(G - 3) 先に挙げた (A - 1) ~ (B - 4) のいずれかのニトリルヒドラーゼをコードする塩基配列を有する遺伝子。

【 0 0 2 6 】

10

上記の変異の基礎となる配列番号： 1 の サブユニットのアミノ酸配列をコードする塩基配列としては、配列番号： 3 の塩基配列が好ましい。また、上記変異の基礎となる配列番号： 2 の サブユニットのアミノ酸配列をコードする塩基配列としては、配列番号： 4 の塩基配列が好ましい。

【 0 0 2 7 】

例えば、配列番号： 3 を基礎とした場合の上記 (a - 1) の変異は、配列番号： 3 の塩基配列の 1 0 6 番目から 1 0 8 番目、 2 1 1 番目から 2 1 3 番目、 4 4 2 番目から 4 4 4 番目、及び 6 1 0 番目から 6 1 2 番目の何れか一つ以上の塩基配列を他の塩基配列に置換して得ることができる。

【 0 0 2 8 】

20

また、配列番号： 3 を基礎とした場合の上記 (a - 2) の変異は、配列番号： 3 の塩基配列の 1 6 番目から 1 8 番目、 5 5 番目から 5 7 番目、 1 1 2 番目から 1 1 4 番目、 2 2 9 番目から 2 3 1 番目、 2 6 8 番目から 2 7 0 番目、 3 0 4 番目から 3 0 6 番目、 3 1 6 番目から 3 1 8 番目、 3 7 6 番目から 3 7 8 番目、 3 8 8 番目から 3 9 0 番目、 4 2 4 番目から 4 2 6 番目、 4 3 6 番目から 4 3 8 番目、 5 5 9 番目から 5 6 1 番目、 5 8 0 番目から 5 8 2 番目、及び 6 0 7 番目から 6 0 9 番目の何れか一つ以上の塩基配列を他の塩基配列に置換した塩基配列の一部を置換して得ることができる。

【 0 0 2 9 】

一方、配列番号： 4 を基礎とした場合の上記 (b - 1) の変異は、配列番号： 4 の塩基配列の 2 8 番目から 3 0 番目、 9 4 番目から 9 6 番目、 1 0 9 番目から 1 1 1 番目、 1 2 1 番目から 1 2 3 番目、 1 3 6 番目から 1 3 8 番目、 1 4 2 番目から 1 4 4 番目、 1 5 1 番目から 1 5 3 番目、 2 1 4 番目から 2 1 6 番目、 3 5 2 番目から 3 5 4 番目、 3 7 9 番目から 3 8 1 番目、 4 3 6 番目から 4 3 8 番目、 4 7 8 番目から 4 8 0 番目、 5 5 6 番目から 5 5 8 番目、及び 6 4 9 番目から 6 5 1 番目の何れか一つ以上の塩基配列を他の塩基配列に置換して得ることができる。

30

【 0 0 3 0 】

また、配列番号： 4 を基礎とした場合の上記 (b - 2) の変異は、配列番号： 4 の塩基配列の 5 8 番目から 6 0 番目、 6 1 番目から 6 3 番目、 3 2 2 番目から 3 2 4 番目、 5 9 8 番目から 6 0 0 番目、及び 6 3 4 番目から 6 3 6 番目の何れか一つ以上の塩基配列を他の塩基配列に置換した塩基配列の一部を置換して得ることができる。

40

【 0 0 3 1 】

これらの置換は、各遺伝子がコードする 及び サブユニットの少なくとも一方が組み込まれたニトリルヒドラーゼの活性が置換前の状態を維持、またはそれよりも向上するような範囲内で行われる。なお、変異導入手段に関しては特に限定されない。

【 0 0 3 2 】

本発明のニトリルヒドラーゼ遺伝子における上記の (a - 1)、(a - 2)、(b - 1) 及び (b - 2) の変異部位以外の部位については、それがニトリルヒドラーゼ活性を有するタンパク質の鋳型として機能できる範囲内で、塩基の置換、挿入または削除による更なる変異を有するものでもよい。

【 0 0 3 3 】

50

このような更なる変異については以下のような例をあげることができる。ある一定の塩基配列を有する遺伝子を鋳型として転写・翻訳された場合であっても、それを導入する宿主細胞の種類や培養に使用する栄養培地の成分や組成若しくは培養時の温度やpH等によっては、遺伝子発現後の宿主細胞内酵素による修飾などにより、所期の酵素作用は保持しているものの配列表におけるN末端付近のアミノ酸の1個又は2個以上が欠失したり、N末端に1個又は2個以上のアミノ酸が新たに付加した異型体を産生する事があり得る。その為、そのような異型なニトリルヒドラーゼも本発明に含まれるものとする。

【0034】

一方、本発明のニトリルヒドラーゼ生産用のプラスミドは上記のニトリルヒドラーゼ遺伝子を用いて調製することができる。具体例としては以下のものを挙げるこのができる 10

(P-1) 先に挙げた(a-1)の変異を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するプラスミド；

(P-2) 先に挙げた(a-1)及び(a-2)の変異を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するプラスミド；

(P-3) 先に挙げた(b-1)の変異を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するプラスミド；

(P-4) 先に挙げた(b-1)及び(b-2)の変異を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するプラスミド；及び

(P-5) 先に挙げた(A-1)～(B-4)のいずれかのニトリルヒドラーゼをコードする塩基配列を有するプラスミド。 20

【0035】

また、本発明にかかる形質転換体または細胞株は、このプラスミドを用いて任意の宿主細胞を形質転換して得られたものである。本発明のニトリルヒドラーゼの生産方法は、上記の形質転換体や細胞株を培養してニトリルヒドラーゼを産生させる工程を有する。また、本発明のアミド化合物の製造方法は、このようなニトリルヒドラーゼを産生する形質転換体や細胞株を培養して得られる培養液、細胞または細胞処理物を媒体中にてニトリル化合物と接触させて対応するアミド化合物を製造させる工程を有する。

【0036】

本発明におけるプラスミドは、ニトリルヒドラーゼの サブユニットをコードする遺伝子、 サブユニットをコードする遺伝子またはニトリルヒドラーゼ遺伝子に加え、各遺伝子の発現に必要な制御領域及び自律複製に必要な領域などの、任意の宿主細胞を形質転換して得られる形質転換体や細胞株によるニトリルヒドラーゼの産生を可能せしめる構成を有することができる。ここでいう任意の宿主細胞とは、後述の実施例の様にその一例として大腸菌が挙げられるが、これに限定されるものではなく、枯草菌等のバチルス属菌、酵母や放線菌等の他の微生物も用いる事ができる。 30

【0037】

発現に必要な制御領域としては、プロモーター配列(転写を制御するオペレーター配列を含む。)、リボゾーム結合配列(SD配列)、転写終結配列等を挙げることができる。具体的なプロモーター配列の例としては、大腸菌由来のトリプトファンオペロンのtrpプロモーター、ラクトースオペロンのlacプロモーター、ラムダファージ由来のPLプロモーター及びPRプロモーターや、枯草菌由来のグルコン酸合成酵素プロモーター(gnt)、アルカリプロテアーゼプロモーター(apr)、中性プロテアーゼプロモーター(npr)、 - アミラーゼプロモーター(amy)等が挙げられる。また、tacプロモーターやtrcプロモーターのように人為的に設計・改変された配列も利用できる。 40

【0038】

リボゾーム結合配列としては、大腸菌由来や枯草菌由来又はシュードノカルディア本来の配列が挙げられるが、大腸菌や枯草菌等の所望の宿主細胞内で機能する配列であれば特に限定されるものではない。たとえば、16SリボゾームRNAの3'末端領域に相補的な配列が4塩基以上連続したコンセンサス配列をDNA合成により作成してこれを利用して 50

もよい。転写終結配列は必ずしも必要ではないが、因子非依存性のもの、例えばリポプロテインターミネーター・trpオペロンターミネーター等が利用できる。これら制御領域のプラスミド上での配列順序は、プロモーター配列とリボゾーム結合配列はニトリルヒドラーゼをコードする遺伝子より5'末端側上流に位置する事が望ましく、転写終結配列はニトリルヒドラーゼをコードする遺伝子より3'末端側下流に位置する事が望ましい。また、その様な制御領域によりサブユニット遺伝子及びサブユニット遺伝子が各々独立のシストロンとして発現されてもよいし、共通の制御領域によりポリシストロンとして発現されてもよい。

【0039】

以上の要件を満たしているプラスミドベクターの例としては、大腸菌中での自律複製可能な領域を有しているpBR322、pUC18、pBluescript、pKK223-3、pSC101や、枯草菌中での自律複製可能な領域を有しているpUB110、pTZ4、pC194、11、1、105等を挙げる事ができる。また、2種類以上の宿主細胞内での自律複製が可能なプラスミドベクターの例として、pHV14、TRp7、YEp7及びpBS7を挙げる事ができる。

10

【0040】

このようなプラスミドベクターに本発明のニトリルヒドラーゼをコードする遺伝子を該ニトリルヒドラーゼの活性発現に必要な領域と共に挿入して本発明のプラスミドを構築する方法、該プラスミドを所望の宿主細胞に形質転換する方法及び該形質転換体内でニトリルヒドラーゼを産生させる方法には、例えば「Molecular Cloning 3rd Edition」(J. Sambrookら; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001)等に記載されている分子生物学・生物工学・遺伝子工学の分野において公知の一般的な方法と宿主細胞が利用できる。

20

【0041】

なお、宿主細胞が微生物の場合、該形質転換体を培養する培地としてLB培地やM9培地などが一般的に用いられるが、より好ましくはそのような培地成分にFeイオン及びCoイオンを0.1 µg/mL以上存在させるとよく、該形質転換体を植菌した後、適当な培養温度(一般的には、20 ~ 50)で生育させればよい。

【0042】

本発明のニトリルヒドラーゼをコードする遺伝子を発現させて所望の酵素活性を有するニトリルヒドラーゼを生産する場合、該ニトリルヒドラーゼの活性化に關与するタンパク質をコードする遺伝子が必要となる。

30

【0043】

このニトリルヒドラーゼの活性化に關与するタンパク質とは、該タンパク質の発現の有無が、ニトリルヒドラーゼの活性化を直接左右する性質を有しているタンパク質の事であり、特開平11-253168号公報に記載されるシュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラーゼ活性化に關与するタンパク質(ニトリルヒドラーゼ活性化タンパク質)をその代表例として挙げる事が出来る。具体的には、ニトリルヒドラーゼ活性化タンパク質としては、配列番号: 5のアミノ酸配列に示される144個のアミノ酸の配列により構成されるものをその代表例として挙げる事が出来る。また、配列番号: 5のアミノ酸配列の一部でのアミノ酸の置換、欠失、削除または挿入により得られた異型タンパク質も、ニトリルヒドラーゼの活性化に關与するものであれば、ニトリルヒドラーゼ活性化タンパク質に含まれるものとする。この異型タンパク質としては、配列番号5のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換または付加による変異を有し、ニトリルヒドラーゼの活性化に關与する性質を維持しているものを挙げる事が出来る。

40

【0044】

ニトリルヒドラーゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子としては、ニトリルヒドラーゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子であれば特に限定されるものではない。この遺伝子としては、上記の配列番号: 5のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子

50

及び上記の異型タンパク質をコードする遺伝子を挙げることができる。更に、このニトリルヒドラーゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子の好ましい例としては、配列番号：6の塩基配列を有する遺伝子を挙げる事が出来る。更に、ニトリルヒドラーゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子には、配列番号：6に記載の塩基配列配列の1個または2個以上について塩基の置換、欠失、削除又は挿入が行われた配列であっても、それがニトリルヒドラーゼの活性化に関与するタンパク質の鋳型として機能する場合には、ニトリルヒドラーゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子の範囲に含まれるものとする。

【0045】

ニトリルヒドラーゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子は、遺伝子組換え技術を用いたニトリルヒドラーゼの生産に利用するプラスミド中に、サブユニットをコードする遺伝子及びサブユニットをコードする遺伝子とともに組み込まれることが好ましい。その場合におけるこれらのプラスミド上における順序は特に限定されず、また、3つの遺伝子が同一の制御領域により制御されてもよく、2つの遺伝子が同一の制御領域により制御され、残る1つの遺伝子が他の2つとは異なる制御領域により制御されてもよく、3つの遺伝子が各々異なる制御領域により制御されてもよい。

10

【0046】

本発明のニトリルヒドラーゼ又はニトリルヒドラーゼ活性を有する形質転換体を利用して、ニトリル化合物から対応するアミド化合物を製造するには、所望のニトリル化合物を、ニトリルヒドラーゼ酵素精製物や粗酵素調製物、該形質転換体の培養液、培養液から得られる形質転換体又は形質転換体の処理物と水性媒体中で接触させればよい。ここでいう処理物とは、該形質転換体からの抽出物や磨砕物、これらの抽出物や磨砕物のニトリルヒドラーゼ活性画分を分離して得られる粗酵素調製物や更に精製して得られる酵素精製物などの後分離物、該形質転換体や該形質転換体の抽出物、磨砕物または後分離物を適当な手段を用いて固定化した固定化物の事を示している。接触させる温度は特に限定されないが、好ましくは該ニトリルヒドラーゼが失活しない温度範囲内であり、より好ましくは0～60である。ニトリル化合物としては、本発明のニトリルヒドラーゼが基質として作用できる化合物であれば特に限定されないが、好ましくはアセトニトリル、プロピオニトリル、アクリロニトリル、メタクリロニトリル、n-ブチロニトリル、イソブチロニトリル、クロトノニトリル、-ヒドロキシイソブチロニトリル等といった炭素数2～4のニトリル化合物がその代表例として挙げられる。該ニトリル化合物の水性媒体中の濃度は、特に限定されるものではなく、また、反応温度も特に限定されないが、好ましくは該ニトリルヒドラーゼが失活しない温度範囲内であり、より好ましくは0～50である。

20

30

【0047】

【実施例】

以下の実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例によって何等限定されるものではない。

【0048】

[参考例1] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(1)

サブユニットの6番目のLeuをMetに置換するために、宝酒造社製の「LA PCR in vitro mutagenesis Kit」を用いた部位特異的な変異導入を行った。以後、「LA PCR in vitro mutagenesis Kit」を単にキットと呼ぶ。以下の参考例では、基本的にキットの原理及び操作方法を踏襲した。

40

【0049】

30mLの試験管に10mLのLB液体培地を調製し、121・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100µg/mLとなるようにアンピシリンを添加した後、MT-10822を一白金耳植菌し、37・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mLを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離(15000rpm×5分)により該菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりプラスミドpPT-DB1を調製した。

50

【0050】

各々10 ngのpPT-DB1を鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：7記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50 µLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98）15秒、アニーリング（55）30秒、伸長反応（72）120秒の条件を25サイクル繰り返す事により行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50 µLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 µLを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。Microcon100（宝酒造社製）を用いてそれぞれのPCR反応終了液より過剰なプライマー及びdNTPを除去した後、TEを加えて各々50 µLの溶液を調製した。該TE溶液を各0.5 µLずつ含む全量47.5 µLのアニーリング溶液（組成はキットに記載の条件による）を調製し、熱変性処理（98）を10分間行った後、37℃まで60分間かけて一定の速度で冷却を行い、続いて37℃で15分間保持することによってアニーリング処理を行った。アニーリング処理液にTakara LA Taqを0.5 µL加えて72℃で3分間加熱処理を行い、ヘテロ2本鎖を完成させた。これにM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol加えて全量を50 µLとした後、熱変性（98）15秒、アニーリング（55）30秒、伸長反応（72）120秒の条件を25サイクル繰り返すことによるPCR反応No. 3を行った。PCR反応No. 3の反応終了液5 µLを用いたアガロース電気泳動（シグマ社製タイプV II低融点アガロース使用；アガロース濃度0.8重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、約2 kbの増幅DNA産物の存在が確認できた。続いて、アガロースゲルから約2 kbのDNA断片のみを切り出し、該アガロース片（約0.1 g）を細かく粉砕し1 mLのTE溶液に懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って該DNA断片を精製し、最終的に10 µLのTEに溶解した。精製した約2 kbの増幅DNA断片を制限酵素EcoRI及びHindIIIにより切断した後、この制限酵素処理液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って該DNA断片を精製し、最終的に10 µLのTEに溶解した。同様に、EcoRI及びHindIIIによりpPT-DB1を切断し、アガロースゲル電気泳動（シグマ社製タイプV II低融点アガロース使用；アガロース濃度0.7%）を行い、アガロースゲルから約2.7 kbのDNA断片のみを切り出した。切り出したアガロース片（約0.1 g）を細かく粉砕し1 mLのTE溶液に懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って該DNA断片を精製し、最終的に10 µLのTEに溶解した。この様にして得られた約2 kbと約2.7 kbのDNA断片をDNAライゲーションキット（宝酒造社製）を用いて連結させた後、大腸菌HB101のコンピテントセル（東洋紡績社製）を形質転換し、形質転換体No. 1を得た。

【0051】

得られた形質転換体を用いたアミド化合物の製造における転化率及び選択率を以下の方法により求めた。

【0052】

500 mLのバッフル付三角フラスコに40 µg/mLの硫酸第二鉄・七水和物及び10 µg/mLの塩化コバルト・二水和物を含む100 mLのLB液体培地を調製し、121℃・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100 µg/mLとなるようにアンピシリンを添加した後、形質転換体No. 1を一白金耳植菌し、37℃・130 rpmにて約20時間培養した。該培養終了液から遠心分離（5000 G×15分）により菌体を分離した。続いて、分離した該菌体を50 mLの生理食塩水に再懸濁した

後に、再度遠心分離（5000 G × 15分）により菌体を分離した。該菌体0.1 gを20 mLの50 mMリン酸カリウム水溶液（pH 7.0）に懸濁し、これに1 mLのアクリロニトリル又はメタアクリロニトリルを添加して10 で緩やかに攪拌しながら1時間反応させた。反応終了後、HPLCを用いて反応液の分析を行った結果、反応液中には添加したニトリル化合物（アクリロニトリル又はメタアクリロニトリル）に相当するモル量のアミド化合物（アクリルアミド又はメタアクリルアミド）のみが存在しており、ニトリル化合物（アクリロニトリル又はメタアクリロニトリル）及び対応する有機酸（アクリル酸又はメタアクリル酸）の存在は認められなかった。すなわち、転化率及び選択率は100%であった。

【0053】

10

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表1に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼのサブユニットの6番目のLeuがMetに置換されていた。

【0054】

【表1】

表1

クローン番号	変異箇所 (α サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 1	α -6番目	Leu	Met	CTG	ATG

20

〔参考例2〕ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（2）

サブユニットの6番目のLeuをThrに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

30

参考例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10 ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：11記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98 ）15秒、アニーリング（55 ）30秒、伸長反応（72 ）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。

40

以後、PCR反応No. 2を含む参考例1における操作と全く同じ操作により、形質転換体No. 2を得た。

【0055】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、100%であった。

【0056】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表2に示し

50

たクローンにおいてニトリルヒドラターゼの サブユニットの6番目のL e uがT h rに置換されていた。

【0057】

【表2】

表2

クローン番号	変異箇所 (α サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 2	α -6番目	L e u	T h r	CTG	ACG

10

【参考例3】ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(3) サブユニットの6番目のL e uをA l aに置換するために、p P T - D B 1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0058】

参考例1で調製したp P T - D B 1のプラスミドDNA 10 n gを各々鋳型として2種類のP C R反応を行った。P C R反応No. 1は、配列表の配列番号：12記載のプライマー及びM 13プライマーM 4(配列表の配列番号：8に配列を記載)を各々50 p m o l含む全量50 μ Lの系(組成はキットに記載の条件による)で、熱変性(98) 15秒、アニーリング(55) 30秒、伸長反応(72) 120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。P C R反応No. 2は、M U T 4プライマー(配列表の配列番号：9に配列を記載)及びM 13プライマーR V(配列表の配列番号：10に配列を記載)を各々50 p m o l含む全量50 μ Lの系(組成はキットに記載の条件による)で、P C R反応No. 1と同様の操作により行った。P C R反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動(アガロース濃度1.0重量%)によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 3を得た。

20

30

【0059】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0060】

また、上記菌体からアルカリS D S抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表3に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの サブユニットの6番目のL e uがA l aに置換されていた。

40

【0061】

【表3】

表3

クローン番号	変異箇所 (α サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 3	α -6番目	Leu	Ala	CTG	GCG

10

〔参考例4〕ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(4) サブユニットの6番目のLeuをValに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0062】

参考例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No.1は、配列表の配列番号:13記載のプライマー及びM13プライマーM4(配列表の配列番号:8に配列を記載)を各々50pmol含む全量50 μ Lの系(組成はキットに記載の条件による)で、熱変性(98)15秒、アニーリング(55)30秒、伸長反応(72)120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No.2は、MUT4プライマー(配列表の配列番号:9に配列を記載)及びM13プライマーRV(配列表の配列番号:10に配列を記載)を各々50pmol含む全量50 μ Lの系(組成はキットに記載の条件による)で、PCR反応No.1と同様の操作により行った。PCR反応No.1及びNo.2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動(アガロース濃度1.0重量%)によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No.4を得た。

20

【0063】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

30

【0064】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表4に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのサブユニットの6番目のLeuがValに置換されていた。

【0065】

【表4】

表4

クローン番号	変異箇所 (α サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 4	α -6番目	Leu	Val	CTG	GTG

40

〔参考例5〕ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(5) サブユ 50

ニットの19番目のA1aをValに置換するために、pP T - D B 1 プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0066】

参考例1で調製したpP T - D B 1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：14記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98）15秒、アニーリング（55）30秒、伸長反応（72）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5μLを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 5を得た。

10

【0067】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0068】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表5に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼのサブユニットの19番目のA1aがValに置換されていた。

20

【0069】

【表5】

表5

クローン番号	変異箇所 (αサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 5	α-19番目	A1a	Val	GCG	GTG

30

【参考例6】ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（6） サブユニットの38番目のMetをLeuに置換するために、pP T - D B 1 プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

40

【0070】

参考例1で調製したpP T - D B 1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：15記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98）15秒、アニーリング（55）30秒、伸長反応（72）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終

50

了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1 . 0 重量 % ）により D N A 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 D N A 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 N o . 6 を得た。

【 0 0 7 1 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 1 0 0 % であった。

【 0 0 7 2 】

また、上記菌体からアルカリ S D S 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 6 に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの サブユニットの 3 8 番目の M e t が L e u に置換されていた。

10

【 0 0 7 3 】

【表 6】

表 6

クローン番号	変異箇所 (α サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
N o . 6	α -38 番目	M e t	L e u	A T G	T T G

20

【参考例 7】ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（7） サブユニットの 7 7 番目の T h r を S e r に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド D N A を鋳型として、参考例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【 0 0 7 4 】

参考例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド D N A 1 0 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 N o . 1 は、配列表の配列番号：1 6 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4（配列表の配列番号：8 に配列を記載）を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（9 8 ）1 5 秒、アニーリング（5 5 ）3 0 秒、伸長反応（7 2 ）1 2 0 秒の条件を 2 5 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 N o . 2 は、M U T 4 プライマー（配列表の配列番号：9 に配列を記載）及び M 1 3 プライマー R V（配列表の配列番号：1 0 に配列を記載）を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、P C R 反応 N o . 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 N o . 1 及び N o . 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1 . 0 重量 % ）により D N A 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 D N A 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 N o . 7 を得た。

30

40

【 0 0 7 5 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 1 0 0 % であった。

【 0 0 7 6 】

また、上記菌体からアルカリ S D S 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 7 に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの サブユニットの 7 7 番目の T h r が S e r に置換されていた。

50

【 0 0 7 7 】

【 表 7 】

表7

クローン番号	変 異 箇 所 (α サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 7	α -77番目	Thr	Ser	ACC	TCC

10

【 参考例 8 】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (8) サブユニットの 90 番目の Gly を Ala に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、参考例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【 0 0 7 8 】

参考例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：17 記載のプライマー及び M 13 プライマー M 4 (配列表の配列番号：8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98) 15 秒、アニーリング (55) 30 秒、伸長反応 (72) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 No. 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号：9 に配列を記載) 及び M 13 プライマー R V (配列表の配列番号：10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 No. 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量 %) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 8 を得た。

20

【 0 0 7 9 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100 % であった。

30

【 0 0 8 0 】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 8 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの サブユニットの 90 番目の Gly が Ala に置換されていた。

【 0 0 8 1 】

【 表 8 】

40

表8

クローン番号	変異箇所 (α サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 8	α -90番目	G l y	A l a	G G C	G C C

10

【参考例9】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(9) サブユニットの102番目のValをAlaに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0082】

参考例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：18記載のプライマー及びM13プライマーM4(配列表の配列番号：8に配列を記載)を各々50pmol含む全量50 μ Lの系(組成はキットに記載の条件による)で、熱変性(98)15秒、アニーリング(55)30秒、伸長反応(72)120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー(配列表の配列番号：9に配列を記載)及びM13プライマーRV(配列表の配列番号：10に配列を記載)を各々50pmol含む全量50 μ Lの系(組成はキットに記載の条件による)で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動(アガロース濃度1.0重量%)によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 9を得た。

20

【0083】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

30

【0084】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表9に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのサブユニットの102番目のValがAlaに置換されていた。

【0085】

【表9】

表9

クローン番号	変異箇所 (α サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 9	α -102番目	V a l	A l a	G T C	G C C

40

【参考例10】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(10)

50

サブユニットの106番目のValをIleに置換するために、pP T - D B 1 プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0086】

参考例1で調製したpP T - D B 1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：19記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5μLを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 10を得た。

【0087】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0088】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表10に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼのサブユニットの106番目のValがIleに置換されていた。

【0089】

【表10】

表10

クローン番号	変異箇所 (αサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 10	α-106番目	Val	Ile	GTC	ATC

[参考例11] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(11)

サブユニットの126番目のPheをTyrに置換するために、pP T - D B 1 プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0090】

参考例1で調製したpP T - D B 1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：20記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終

了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1 . 0 重量 % ）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No . 1 1 を得た。

【 0 0 9 1 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 1 0 0 % であった。

【 0 0 9 2 】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 1 1 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの サブユニットの 1 2 6 番目の P h e が T y r に置換されていた。

10

【 0 0 9 3 】

【表 1 1】

表 1 1

クローン番号	変異箇所 (α サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 1 1	α -1 2 6 番目	P h e	T y r	T T C	T A C

20

[参考例 1 2] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (1 2)

サブユニットの 1 3 0 番目の G l n を G l u に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、参考例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【 0 0 9 4 】

参考例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 1 0 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No . 1 は、配列表の配列番号 : 2 1 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号 : 8 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (9 8) 1 5 秒、アニーリング (5 5) 3 0 秒、伸長反応 (7 2) 1 2 0 秒の条件を 2 5 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 No . 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号 : 9 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号 : 1 0 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 No . 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 No . 1 及び No . 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1 . 0 重量 % ）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No . 1 2 を得た。

30

【 0 0 9 5 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 1 0 0 % であった。

【 0 0 9 6 】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 1 2 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの サブユニットの 1 3 0 番目の G l n が G l u に置換されていた。

40

50

【 0 0 9 7 】

【 表 1 2 】

表 1 2

クローン番号	変 異 箇 所 (α サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 12	α -130番目	Gln	Glu	CAG	GAG

10

【 参考例 1 3 】 ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (1 3)

サブユニットの 1 4 2 番目の Leu を Val に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、参考例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【 0 0 9 8 】

参考例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 1 0 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号 : 2 2 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号 : 8 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (9 8) 1 5 秒、アニーリング (5 5) 3 0 秒、伸長反応 (7 2) 1 2 0 秒の条件を 2 5 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 No. 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号 : 9 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号 : 1 0 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 No. 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1 . 0 重量 %) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 1 3 を得た。

20

【 0 0 9 9 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 1 0 0 % であった。

30

【 0 1 0 0 】

また、上記菌体からアルカリ S D S 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 1 3 に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼのサブユニットの 1 4 2 番目の Leu が Val に置換されていた。

【 0 1 0 1 】

【 表 1 3 】

40

表 1 3

クローン番号	変 異 箇 所 (α サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 13	α -142番目	Leu	Val	CTG	GTG

10

[参考例 1 4] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (1 4)

サブユニットの 1 4 6 番目の Glu を Asp に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、参考例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【 0 1 0 2 】

参考例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 1 0 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号 : 2 3 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号 : 8 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (9 8) 1 5 秒、アニーリング (5 5) 3 0 秒、伸長反応 (7 2) 1 2 0 秒の条件を 2 5 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 No. 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号 : 9 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号 : 1 0 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 No. 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1 . 0 重量 %) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 1 4 を得た。

20

【 0 1 0 3 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 1 0 0 % であった。

30

【 0 1 0 4 】

また、上記菌体からアルカリ S D S 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 1 4 に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼのサブユニットの 1 4 6 番目の Glu が Asp に置換されていた。

【 0 1 0 5 】

【 表 1 4 】

表 1 4

クローン番号	変 異 箇 所 (α サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 14	α -146番目	Glu	Asp	GAG	GAC

40

[参考例 1 5] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (1 5)

50

サブユニットの187番目のAlaをThrに置換するために、pP T - D B 1 プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0106】

参考例1で調製したpP T - D B 1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：24記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5μLを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 15を得た。

10

【0107】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0108】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表15に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼのサブユニットの187番目のAlaがThrに置換されていた。

20

【0109】

【表15】

表15

クローン番号	変異箇所 (αサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 15	α-187番目	Ala	Thr	GCC	ACC

30

[参考例16] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(16)

サブユニットの194番目のSerをLeuに置換するために、pP T - D B 1 プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

40

【0110】

参考例1で調製したpP T - D B 1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：25記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終

50

了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1 . 0 重量 % ）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No . 1 6 を得た。

【 0 1 1 1 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 1 0 0 % であった。

【 0 1 1 2 】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 1 6 に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの サブユニットの 1 9 4 番目の Ser が Leu に置換されていた。

10

【 0 1 1 3 】

【表 1 6 】

表 1 6

クローン番号	変異箇所 (α サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 1 6	α -1 9 4 番目	Ser	Leu	TCG	TTG

20

[参考例 1 7] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (1 7)

サブユニットの 2 0 3 番目の Ala を Glu に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、参考例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【 0 1 1 4 】

参考例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 1 0 n g を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No . 1 は、配列表の配列番号 : 2 6 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号 : 8 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (9 8) 1 5 秒、アニーリング (5 5) 3 0 秒、伸長反応 (7 2) 1 2 0 秒の条件を 2 5 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No . 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号 : 9 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号 : 1 0 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No . 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No . 1 及び No . 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1 . 0 重量 % ）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No . 1 7 を得た。

30

40

【 0 1 1 5 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 1 0 0 % であった。

【 0 1 1 6 】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 1 7 に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの サブユニットの 2 0 3 番目の Ala が Glu に置換されていた。

50

【 0 1 1 7 】

【 表 1 7 】

表 1 7

クローン番号	変 異 箇 所 (α サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 17	α -203番目	A l a	G l u	G C G	G A G

10

【 参考例 1 8 】 ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (1 8)

サブユニットの 2 0 番目の A l a を V a l に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、参考例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

参考例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 1 0 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：27 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号：8 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (9 8) 1 5 秒、アニーリング (5 5) 3 0 秒、伸長反応 (7 2) 1 2 0 秒の条件を 2 5 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 No. 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号：9 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号：10 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 No. 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1 . 0 重量 %) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。

20

以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 1 8 を得た。

【 0 1 1 8 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 1 0 0 % であった。

30

【 0 1 1 9 】

また、上記菌体からアルカリ S D S 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 1 8 に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼのサブユニットの 2 0 番目の A l a が V a l に変換されていた。

【 0 1 2 0 】

【 表 1 8 】

表 1 8

40

クローン番号	変 異 箇 所 (β サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 18	β -20番目	A l a	V a l	G C G	G T G

50

【参考例 19】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (19)

サブユニットの 21 番目の Asp を Asn に置換するために、pP T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、参考例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0121】

参考例 1 で調製した pP T - D B 1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：28 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号：8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98) 15 秒、アニーリング (55) 30 秒、伸長反応 (72) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号：9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号：10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 19 を得た。

【0122】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100 % であった。

【0123】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 19 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのサブユニットの 21 番目の Asp が Asn に置換されていた。

【0124】

【表 19】

表 19

クローン番号	変異箇所 (β サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 19	β -21 番目	Asp	Asn	GAC	AAC

【参考例 20】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (20)

サブユニットの 108 番目の Glu を Asp に置換するために、pP T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、参考例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0125】

参考例 1 で調製した pP T - D B 1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：29 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号：8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98) 15 秒、アニーリング (55) 30 秒、伸長反応 (72) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号：9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号：10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P

10

20

30

40

50

50

50

表 20

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 20	β-108番目	G l u	A s p	G A G	G A T

30

40

50

30

40

50

50

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表21に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼのサブユニットの108番目のGluがP

r o に置換されていた。

【 0 1 3 2 】

【 表 2 1 】

表 2 1

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 21	β-108番目	G l u	P r o	G A G	C C G

10

【 参考例 2 2 】 ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (2 2)

サブユニットの 1 0 8 番目の G l u を S e r に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、参考例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【 0 1 3 3 】

参考例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 1 0 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：3 1 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号：8 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (9 8) 1 5 秒、アニーリング (5 5) 3 0 秒、伸長反応 (7 2) 1 2 0 秒の条件を 2 5 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 No. 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号：9 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号：1 0 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 No. 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1 . 0 重量 %) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 2 2 を得た。

20

30

【 0 1 3 4 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 1 0 0 % であった。

【 0 1 3 5 】

また、上記菌体からアルカリ S D S 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 2 2 に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼのサブユニットの 1 0 8 番目の G l u が S e r に置換されていた。

【 0 1 3 6 】

【 表 2 2 】

40

表 2 2

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 22	β-108番目	G l u	S e r	GAG	TCG

10

【参考例 2 3】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（2 3）

サブユニットの 1 0 8 番目の G l u を A r g に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、参考例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0 1 3 7】

参考例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 1 0 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：3 2 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4（配列表の配列番号：8 に配列を記載）を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（9 8 ）1 5 秒、アニーリング（5 5 ）3 0 秒、伸長反応（7 2 ）1 2 0 秒の条件を 2 5 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 No. 2 は、M U T 4 プライマー（配列表の配列番号：9 に配列を記載）及び M 1 3 プライマー R V（配列表の配列番号：1 0 に配列を記載）を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、P C R 反応 No. 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1 . 0 重量％）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 2 3 を得た。

20

【0 1 3 8】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 1 0 0 % であった。

30

【0 1 3 9】

また、上記菌体からアルカリ S D S 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 2 3 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのサブユニットの 1 0 8 番目の G l u が A r g に置換されていた。

【0 1 4 0】

【表 2 3】

表 2 3

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 23	β-108番目	G l u	A r g	GAG	CGG

40

【参考例 2 4】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（2 4）

50

サブユニットの108番目のGluをCysに置換するために、pP T - D B 1 プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0141】

参考例1で調製したpP T - D B 1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：33記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98）15秒、アニーリング（55）30秒、伸長反応（72）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5μLを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 24を得た。

【0142】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0143】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表24に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼのサブユニットの108番目のGluがCysに置換されていた。

【0144】

【表24】

表24

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 24	β-108番目	Glu	Cys	GAG	TGC

[参考例25] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(25)

サブユニットの108番目のGluをLeuに置換するために、pP T - D B 1 プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0145】

参考例1で調製したpP T - D B 1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：34記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98）15秒、アニーリング（55）30秒、伸長反応（72）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終

了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1 . 0 重量 % ）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No . 2 5 を得た。

【 0 1 4 6 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 1 0 0 % であった。

【 0 1 4 7 】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 2 5 に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの サブユニットの 1 0 8 番目の G l u が L e u に置換されていた。

10

【 0 1 4 8 】

【表 2 5 】

表 2 5

クローン番号	変 異 箇 所 (β サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 2 5	β -1 0 8 番目	G l u	L e u	G A G	C T G

20

[参考例 2 6] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (2 6)

サブユニットの 1 0 8 番目の G l u を T h r に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、参考例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【 0 1 4 9 】

参考例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 1 0 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No . 1 は、配列表の配列番号 : 3 5 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号 : 8 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (9 8) 1 5 秒、アニーリング (5 5) 3 0 秒、伸長反応 (7 2) 1 2 0 秒の条件を 2 5 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 No . 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号 : 9 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号 : 1 0 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 No . 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 No . 1 及び No . 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1 . 0 重量 % ）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No . 2 6 を得た。

30

【 0 1 5 0 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 1 0 0 % であった。

【 0 1 5 1 】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 2 6 に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの サブユニットの 1 0 8 番目の G l u が T h r に置換されていた。

40

50

【 0 1 5 2 】

【 表 2 6 】

表 2 6

クローン番号	変 異 箇 所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 26	β-108番目	G l u	T h r	G A G	A C G

10

【 参考例 2 7 】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (2 7)

サブユニットの 2 0 0 番目の A l a を A s p に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、参考例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【 0 1 5 3 】

参考例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 1 0 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：3 6 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号：8 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (9 8) 1 5 秒、アニーリング (5 5) 3 0 秒、伸長反応 (7 2) 1 2 0 秒の条件を 2 5 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 No. 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号：9 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号：1 0 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 No. 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1 . 0 重量 %) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 2 7 を得た。

20

【 0 1 5 4 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 1 0 0 % であった。

30

【 0 1 5 5 】

また、上記菌体からアルカリ S D S 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 2 7 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのサブユニットの 2 0 0 番目の A l a が A s p に置換されていた。

【 0 1 5 6 】

【 表 2 7 】

40

表 27

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 27	β-200番目	Ala	Asp	GCC	GAC

10

【参考例28】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(28)

サブユニットの200番目のAlaをIleに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0157】

参考例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No.1は、配列表の配列番号:37記載のプライマー及びM13プライマーM4(配列表の配列番号:8に配列を記載)を各々50pmol含む全量50μLの系(組成はキットに記載の条件による)で、熱変性(98℃)15秒、アニーリング(55℃)30秒、伸長反応(72℃)120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No.2は、MUT4プライマー(配列表の配列番号:9に配列を記載)及びM13プライマーRV(配列表の配列番号:10に配列を記載)を各々50pmol含む全量50μLの系(組成はキットに記載の条件による)で、PCR反応No.1と同様の操作により行った。PCR反応No.1及びNo.2の反応終了液各5μLを用いたアガロース電気泳動(アガロース濃度1.0重量%)によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No.28を得た。

20

【0158】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

30

【0159】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表28に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのサブユニットの200番目のAlaがIleに置換されていた。

【0160】

【表28】

表 28

40

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 28	β-200番目	Ala	Ile	GCC	ATC

【参考例29】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(29)

50

サブユニットの200番目のAlaをValに置換するために、pP T - D B 1 プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0161】

参考例1で調製したpP T - D B 1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：38記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98）15秒、アニーリング（55）30秒、伸長反応（72）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5μLを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 29を得た。

【0162】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0163】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表29に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼのサブユニットの200番目のAlaがValに置換されていた。

【0164】

【表29】

表29

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 29	β-200番目	Ala	Val	GCC	GTC

[参考例30] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(30)

サブユニットの200番目のAlaをGluに置換するために、pP T - D B 1 プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0165】

参考例1で調製したpP T - D B 1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：39記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98）15秒、アニーリング（55）30秒、伸長反応（72）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終

了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1 . 0 重量 % ）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No . 3 0 を得た。

【 0 1 6 6 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 1 0 0 % であった。

【 0 1 6 7 】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 3 0 に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの サブユニットの 2 0 0 番目の A l a が G l u に置換されていた。

10

【 0 1 6 8 】

【表 3 0 】

表 3 0

クローン番号	変 異 箇 所 (β サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 3 0	β - 2 0 0 番目	A l a	G l u	G C C	G A G

20

[参考例 3 1] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (3 1)

サブユニットの 2 1 2 番目の S e r を T y r に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、参考例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【 0 1 6 9 】

参考例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 1 0 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No . 1 は、配列表の配列番号 : 4 0 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号 : 8 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (9 8) 1 5 秒、アニーリング (5 5) 3 0 秒、伸長反応 (7 2) 1 2 0 秒の条件を 2 5 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 No . 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号 : 9 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号 : 1 0 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 No . 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 No . 1 及び No . 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1 . 0 重量 % ）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No . 3 1 を得た。

30

40

【 0 1 7 0 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 1 0 0 % であった。

【 0 1 7 1 】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 3 1 に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの サブユニットの 2 1 2 番目の S e r が T y r に置換されていた。

50

【 0 1 7 2 】

【 表 3 1 】

表 3 1

クローン番号	変 異 箇 所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 31	β-212番目	Ser	Tyr	TCC	TAC

10

【 参考例 3 2 】 ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (3 2)

クローン No. 5 のアミノ酸変異 (サブユニットの 1 9 番目 : A l a が V a l) とクローン No. 1 1 のアミノ酸変異 (サブユニットの 1 2 6 番目 : P h e が T y r) を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認した。

【 0 1 7 3 】

3 0 m l の試験管に 1 0 m l の L B 液体培地を調製し、 1 2 1 ・ 2 0 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が 1 0 0 μ g / m l となるようにアンピシリンを添加した後、参考例 1 1 で得られたクローン No. 1 1 を一白金耳植菌し、 3 7 ・ 3 0 0 r p m にて約 2 0 時間培養した。該培養液 1 m l を適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (1 5 0 0 0 r p m × 5 分) により菌体を分離した。続いてアルカリ S D S 抽出法により該菌体よりクローン No. 1 1 のプラスミド D N A を調製した。

20

【 0 1 7 4 】

クローン No. 1 1 のプラスミド D N A 1 μ g を鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。 P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号 : 1 4 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号 : 8 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (9 8) 1 5 秒、アニーリング (5 5) 3 0 秒、伸長反応 (7 2) 1 2 0 秒の条件を 2 5 サイクル繰り返すことにより行った。 P C R 反応 No. 2 は、 M U T 4 プライマー (配列表の配列番号 : 9 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号 : 1 0 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、 P C R 反応 No. 1 と同様の操作により行った。 P C R 反応 No. 1 および No. 2 の反応終了液各 5 μ l を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1 . 0 重量 %) により D N A 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 D N A 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 3 2 を得た。

30

【 0 1 7 5 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 1 0 0 % であった。

40

【 0 1 7 6 】

また、上記菌体からアルカリ S D S 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、 A B I 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 3 2 に示したように野生型のニトリルヒドラターゼの サブユニットの 1 9 番目の A l a が V a l に、 サブユニットの 1 2 6 番目の P h e が T y r にそれぞれ置換されていた。

【 0 1 7 7 】

【 表 3 2 】

表 3 2

クローン番号	変異箇所 (α サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 32	α -19番目	A l a	V a l	G C G	G T G
	α -126番目	P h e	T y r	T T C	T A C

10

【参考例 3 3】ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (3 3)

クローン No. 1 のアミノ酸変異 (サブユニットの 6 番目: L e u が M e t) とクローン No. 3 2 のアミノ酸変異 (サブユニットの 1 9 番目の A l a が V a l ; サブユニットの 1 2 6 番目の P h e が T y r) を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認した。

【0 1 7 8】

3 0 m l の試験管に 1 0 m l の L B 液体培地を調製し、1 2 1 ・ 2 0 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が 1 0 0 μ g / m l となるようにアンピシリンを添加した後、参考例 3 2 で得られたクローン No. 3 2 を一白金耳植菌し、3 7 ・ 3 0 0 r p m にて約 2 0 時間培養した。該培養液 1 m l を適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (1 5 0 0 0 r p m \times 5 分) により菌体を分離した。続いてアルカリ S D S 抽出法により該菌体よりクローン No. 3 2 のプラスミド D N A を調製した。

20

【0 1 7 9】

クローン No. 3 2 のプラスミド D N A 1 μ g を鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 7 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (9 8) 1 5 秒、アニーリング (5 5) 3 0 秒、伸長反応 (7 2) 1 2 0 秒の条件を 2 5 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 No. 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号: 1 0 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 No. 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 No. 1 および No. 2 の反応終了液各 5 μ l を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1 . 0 重量 %) により D N A 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 D N A 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 3 3 を得た。

30

【0 1 8 0】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 1 0 0 % であった。

40

【0 1 8 1】

また、上記菌体からアルカリ S D S 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 3 3 に示したように野生型のニトリルヒドラターゼの サブユニットの 6 番目の L e u が M e t に、 サブユニットの 1 9 番目の A l a が V a l に、 サブユニットの 1 2 6 番目の P h e が T y r にそれぞれ置換されていた。

【0 1 8 2】

【表 3 3】

50

表 3 3

クローン番号	変 異 箇 所 (α サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 33	α -6番目	L e u	M e t	CTG	ATG
	α -19番目	A l a	V a l	GCG	GTG
	α -126番目	P h e	T y r	TTC	TAC

10

【参考例 3 4】ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (3 4)
クローン No. 2 のアミノ酸変異 (サブユニットの 6 番目: L e u が T h r) とクローン No. 3 2 のアミノ酸変異 (サブユニットの 1 9 番目の A l a が V a l ; サブユニットの 1 2 6 番目の P h e が T y r) を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認した。

20

【0 1 8 3】

参考例 3 3 で調製したクローン No. 3 2 のプラスミド DNA 1 μ g を鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 1 1 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (9 8) 1 5 秒、アニーリング (5 5) 3 0 秒、伸長反応 (7 2) 1 2 0 秒の条件を 2 5 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号: 1 0 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 および No. 2 の反応終了液各 5 μ l を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1 . 0 重量 %) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 3 4 を得た。

30

【0 1 8 4】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 1 0 0 % であった。

【0 1 8 5】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 3 4 に示したように野生型のニトリルヒドラターゼの サブユニットの 6 番目の L e u が T h r に、サブユニットの 1 9 番目の A l a が V a l に、サブユニットの 1 2 6 番目の P h e が T y r にそれぞれ置換されていた。

40

【0 1 8 6】

【表 3 4】

表 3 4

クローン番号	変 異 箇 所 (α サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 3 4	α -6 番目	L e u	T h r	CTG	ACG
	α -1 9 番目	A l a	V a l	GCG	GTG
	α -1 2 6 番目	P h e	T y r	TTC	TAC

10

【参考例 3 5】ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (3 5)

クローン No. 3 のアミノ酸変異 (サブユニットの 6 番目 : L e u が A l a) とクローン No. 3 2 のアミノ酸変異 (サブユニットの 1 9 番目の A l a が V a l ; サブユニットの 1 2 6 番目の P h e が T y r) を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認した。

【 0 1 8 7 】

参考例 3 3 で調製したクローン No. 3 2 のプラスミド DNA 1 μ g を鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号 : 1 2 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号 : 8 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (9 8) 1 5 秒、アニーリング (5 5) 3 0 秒、伸長反応 (7 2) 1 2 0 秒の条件を 2 5 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号 : 9 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号 : 1 0 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 および No. 2 の反応終了液各 5 μ l を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1 . 0 重量 %) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 3 5 を得た。

【 0 1 8 8 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 1 0 0 % であった。

【 0 1 8 9 】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 3 5 に示したように野生型のニトリルヒドラターゼの サブユニットの 6 番目の L e u が A l a に、サブユニットの 1 9 番目の A l a が V a l に、サブユニットの 1 2 6 番目の P h e が T y r にそれぞれ置換されていた。

【 0 1 9 0 】

【表 3 5】

20

30

40

表 3 5

クローン番号	変異箇所 (α サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 35	α -6番目	L e u	A l a	CTG	GCG
	α -19番目	A l a	V a l	GCG	GTG
	α -126番目	P h e	T y r	TTC	TAC

10

【参考例 3 6】ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (3 6)
クローン No. 2 0 のアミノ酸変異 (サブユニットの 1 0 8 番目: G l u が A s p) と
クローン No. 3 1 のアミノ酸変異 (サブユニットの 2 1 2 番目: S e r が T y r) を
共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されているこ
ことを確認した。

【0 1 9 1】

3 0 m l の試験管に 1 0 m l の L B 液体培地を調製し、1 2 1 ・ 2 0 分間のオートクレー
ブにより滅菌した。この培地に終濃度が 1 0 0 μ g / m l となるようにアンピシリンを
添加した後、参考例 3 1 で得られたクローン No. 3 1 を一白金耳植菌し、3 7 ・ 3 0
0 r p m にて約 2 0 時間培養した。該培養液 1 m l を適当な遠心チューブに分取した後、
遠心分離 (1 5 0 0 0 r p m \times 5 分) により菌体を分離した。続いてアルカリ S D S 抽出
法により該菌体よりクローン No. 3 1 のプラスミド D N A を調製した。

【0 1 9 2】

クローン No. 3 1 のプラスミド D N A 1 μ g を鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。
P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 2 9 記載のプライマー及び M 1 3 プライマ
ー M 4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ l の系
(組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (9 8) 1 5 秒、アニーリング (5 5
) 3 0 秒、伸長反応 (7 2) 1 2 0 秒の条件を 2 5 サイクル繰り返すことにより行っ
た。P C R 反応 No. 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載)
及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号: 1 0 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l
含む全量 5 0 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 No. 1 と同
様の操作により行った。P C R 反応 No. 1 および No. 2 の反応終了液各 5 μ l を用い
たアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1 . 0 重量 %) により D N A 増幅産物の分析を行
ったところ、増幅 D N A 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により
、形質転換体 No. 3 6 を得た。

【0 1 9 3】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は
1 0 0 % であった。

【0 1 9 4】

また、上記菌体からアルカリ S D S 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I
社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法
によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 3 6 に示
したように野生型のニトリルヒドラターゼの サブユニットの 1 0 8 番目の G l u が A s
p に、 サブユニットの 2 1 2 番目の S e r が T y r にそれぞれ置換されていた。

【0 1 9 5】

【表 3 6】

20

30

40

50

表 3 6

クローン番号	変異箇所 (β サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 36	β -108番目 β -212番目	G l u S e r	A s p T y r	GAG TCC	GAT TAC

10

【参考例 37】ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (37)

クローン No. 23 のアミノ酸変異 (サブユニットの 108 番目: G l u が A r g) とクローン No. 31 のアミノ酸変異 (サブユニットの 212 番目: S e r が T y r) を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認した。

【0196】

参考例 36 で調製したクローン No. 31 のプラスミド DNA 1 μ g を鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 32 記載のプライマー及び M 13 プライマー M 4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 p m o l 含む全量 50 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98) 15 秒、アニーリング (55) 30 秒、伸長反応 (72) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 No. 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M 13 プライマー R V (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 p m o l 含む全量 50 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 No. 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 No. 1 および No. 2 の反応終了液各 5 μ l を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量 %) により D N A 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 D N A 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 37 を得た。

20

30

【0197】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100 % であった。

【0198】

また、上記菌体からアルカリ S D S 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 37 に示したように野生型のニトリルヒドラターゼの サブユニットの 108 番目の G l u が A r g に、 サブユニットの 212 番目の S e r が T y r にそれぞれ置換されていた。

40

【0199】

【表 37】

表 3 7

クローン番号	変 異 箇 所 (β サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 37	β -108番目	G l u	A r g	G A G	C G G
	β -212番目	S e r	T y r	T C C	T A C

10

【参考例 3 8】ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (3 8)

クローン No. 27 のアミノ酸変異 (サブユニットの 200 番目: A l a が A s p) とクローン No. 31 のアミノ酸変異 (サブユニットの 212 番目: S e r が T y r) を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認した。

【0200】

参考例 36 で調製したクローン No. 31 のプラスミド DNA 1 μ g を鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 36 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 p m o l 含む全量 50 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98) 15 秒、アニーリング (55) 30 秒、伸長反応 (72) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 p m o l 含む全量 50 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 No. 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 No. 1 および No. 2 の反応終了液各 5 μ l を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 38 を得た。

20

30

【0201】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0202】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 38 に示したように野生型のニトリルヒドラターゼの サブユニットの 200 番目の A l a が A s p に、サブユニットの 212 番目の S e r が T y r にそれぞれ置換されていた。

40

【0203】

【表 38】

表 3 8

クローン番号	変 異 箇 所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 38	β-200番目	A l a	A s p	G C C	G A C
	β-212番目	S e r	T y r	T C C	T A C

10

【参考例 39】ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (39)

クローン No. 30 のアミノ酸変異 (サブユニットの 200 番目: A l a が G l u) とクローン No. 31 のアミノ酸変異 (サブユニットの 212 番目: S e r が T y r) を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認した。

【0204】

参考例 36 で調製したクローン No. 31 のプラスミド DNA 1 μg を鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番 39 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μl の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98) 15 秒、アニーリング (55) 30 秒、伸長反応 (72) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μl の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 および No. 2 の反応終了液各 5 μl を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。

20

30

以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 39 を得た。

【0205】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0206】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 39 に示したように野生型のニトリルヒドラターゼのサブユニットの 200 番目の A l a が G l u に、サブユニットの 212 番目の S e r が T y r にそれぞれ置換されていた。

40

【0207】

【表 39】

表 3 9

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 39	β-200番目	Ala	Glu	GCC	GAG
	β-212番目	Ser	Tyr	TCC	TAC

10

[実施例1] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(40)

サブユニットの36番目のThrをMetに置換するために、宝酒造社製の「LA PCR in vitro mutagenesis Kit」を用いた部位特異的な変異導入を行った。以後、「LA PCR in vitro mutagenesis Kit」を単にキットと呼ぶ。以下の実施例では、基本的にキットの原理及び操作方を踏襲した。30mLの試験管に10mLのLB液体培地を調製し、121・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100μg/mLとなるようにアンピシリンを添加した後、MT-10822を一白金耳植菌し、37・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mLを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離(15000rpm×5分)により該菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりプラスミドpPT-DB1を調製した。

20

【0208】

各々10ngのpPT-DB1を鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No.1は、配列表の配列番号：41記載のプライマー及びM13プライマーM4(配列表の配列番号：8に配列を記載)を各々50pmol含む全量50μLの系(組成はキットに記載の条件による)で、熱変性(98)15秒、アニーリング(55)30秒、伸長反応(72)120秒の条件を25サイクル繰り返す事により行った。PCR反応No.2は、MUT4プライマー(配列表の配列番号：9に配列を記載)及びM13プライマーRV(配列表の配列番号：10に配列を記載)を各々50pmol含む全量50μLの系(組成はキットに記載の条件による)で、PCR反応No.1と同様の操作により行った。

30

PCR反応No.1及びNo.2の反応終了液各5μLを用いたアガロース電気泳動(アガロース濃度1.0重量%)によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。Microcon100(宝酒造社製)を用いてそれぞれのPCR反応終了液より過剰なプライマー及びdNTPを除去した後、TEを加えて各々50μLの溶液を調製した。該TE溶液を各0.5μLずつ含む全量47.5μLのアニーリング溶液(組成はキットに記載の条件による)を調製し、熱変性処理(98)を10分間行った後、37まで60分間かけて一定の速度で冷却を行い、続いて37で15分間保持することによってアニーリング処理を行った。アニーリング処理液にTAKARA LA Taqを0.5μL加えて72で3分間加熱処理を行い、ヘテロ2本鎖を完成させた。これにM13プライマーM4(配列表の配列番号：8に配列を記載)及びM13プライマーRV(配列表の配列番号：10に配列を記載)を各々50pmol加えて全量を50μLとした後、熱変性(98)15秒、アニーリング(55)30秒、伸長反応(72)120秒の条件を25サイクル繰り返すことによるPCR反応No.3を行った。PCR反応No.3の反応終了液5μLを用いたアガロース電気泳動(シグマ社製タイプVII低融点アガロース使用;アガロース濃度0.8重量%)によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、約2kbの増幅DNA産物の存在が確認できた。続いて、アガロ

40

50

ースゲルから約 2 K b の D N A 断片のみを切り出し、該アガロース片（約 0 . 1 g ）を細かく粉砕し 1 m L の T E 溶液に懸濁後、55 で 1 時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って該 D N A 断片を精製し、最終的に 10 μ L の T E に溶解した。精製した約 2 k b の増幅 D N A 断片を制限酵素 E c o R I 及び H i n d I I I により切断した後、この制限酵素処理液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って該 D N A 断片を精製し、最終的に 10 μ L の T E に溶解した。同様に、E c o R I 及び H i n d I I I により p P T - D B 1 を切断し、アガロースゲル電気泳動（シグマ社製タイプ V I I 低融点アガロース使用；アガロース濃度 0 . 7 % ）を行い、アガロースゲルから約 2 . 7 K b の D N A 断片のみを切り出した。切り出したアガロース片（約 0 . 1 g ）を細かく粉砕し 1 m L の T E 溶液に懸濁後、55 で 1 時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って該 D N A 断片を精製し、最終的に 10 μ L の T E に溶解した。この様にして得られた約 2 k b と約 2 . 7 K b の D N A 断片を D N A ライゲーションキット（宝酒造社製）を用いて連結させた後、大腸菌 H B 1 0 1 のコンピテントセル（東洋紡績社製）を形質転換し、形質転換体 N o . 4 0 を得た。

【 0 2 0 9 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 1 0 0 % であった。

【 0 2 1 0 】

また、上記菌体からアルカリ S D S 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 4 0 に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼのサブユニットの 3 6 番目の T h r が M e t に置換されている事を確認した。

【 0 2 1 1 】

【表 4 0 】

表 4 0

クローン番号	変異箇所 (α サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
N o . 4 0	α - 3 6 番目	T h r	M e t	A C G	A T G

【 実施例 2 】ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（ 4 1 ）

サブユニットの 7 1 番目の A r g を H i s に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド D N A を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【 0 2 1 2 】

実施例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド D N A 1 0 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 N o . 1 は、配列表の配列番号： 4 2 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 （配列表の配列番号： 8 に配列を記載）を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（ 9 8 ） 1 5 秒、アニーリング（ 5 5 ） 3 0 秒、伸長反応（ 7 2 ） 1 2 0 秒の条件を 2 5 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 N o . 2 は、M U T 4 プライマー（配列表の配列番号： 9 に配列を記載）及び M 1 3 プライマー R V （配列表の配列番号： 1 0 に配列を記載）を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、P C R 反応 N o . 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 N o . 1 及び N o . 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1 . 0 重量 % ）により D N A 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 D N A 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 N o . 4 1 を得た。

【0213】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0214】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表41に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼのサブユニットの71番目のArgがHisに置換されている事を確認した。

【0215】

【表41】

表41

クローン番号	変異箇所 (α サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 41	α -71番目	Arg	His	CGT	CAT

[実施例3] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(42)

サブユニットの148番目のGlyをAspに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：43記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98）15秒、アニーリング（55）30秒、伸長反応（72）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 42を得た。

【0216】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0217】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表42に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼのサブユニットの148番目のGlyがAspに置換されている事を確認した。

【0218】

【表42】

10

20

30

40

表 4 2

クローン番号	変異箇所 (α サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 42	α -148番目	G l y	A s p	G G C	G A C

[実施例 4] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (4 3)

サブユニットの 2 0 4 番目の V a l を A r g に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【 0 2 1 9 】

実施例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 1 0 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号 : 4 4 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号 : 8 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (9 8) 1 5 秒、アニーリング (5 5) 3 0 秒、伸長反応 (7 2) 1 2 0 秒の条件を 2 5 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 No. 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号 : 9 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号 : 1 0 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 No. 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1 . 0 重量 %) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 4 3 を得た。

【 0 2 2 0 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 1 0 0 % であった。

【 0 2 2 1 】

また、上記菌体からアルカリ S D S 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 4 3 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのサブユニットの 2 0 4 番目の V a l が A r g に置換されている事を確認した。

【 0 2 2 2 】

【 表 4 3 】

表 4 3

クローン番号	変異箇所 (α サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 43	α -204番目	V a l	A r g	G T C	C G C

[実施例 5] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (4 4)

サブユニットの 2 0 4 番目の V a l を L y s に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。実施例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 1 0 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号 : 4 5 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号 : 8 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (9 8) 1 5 秒

、アニーリング（５５）３０秒、伸長反応（７２）１２０秒の条件を２５サイクル繰り返すことにより行った。ＰＣＲ反応Ｎｏ．２は、ＭＵＴ４プライマー（配列表の配列番号：９に配列を記載）及びＭ１３プライマーＲＶ（配列表の配列番号：１０に配列を記載）を各々５０ｐｍｏｌ含む全量５０μＬの系（組成はキットに記載の条件による）で、ＰＣＲ反応Ｎｏ．１と同様の操作により行った。ＰＣＲ反応Ｎｏ．１及びＮｏ．２の反応終了液各５μＬを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度１．０重量％）によりＤＮＡ増幅産物の分析を行ったところ、増幅ＤＮＡ産物の存在が確認できた。以後、実施例１と全く同じ操作により、形質転換体Ｎｏ．４４を得た。

【０２２３】

次に、参考例１と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は１００％であった。 10

【０２２４】

また、上記菌体からアルカリＳＤＳ抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ＡＢＩ社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー３７３Ａを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表４４に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのサブユニットの２０４番目のＶａｌがＬｙｓに置換されている事を確認した。

【０２２５】

【表４４】

表４４

20

クローン番号	変異箇所 (αサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 44	α-204番目	Val	Lys	GTC	AAA

【実施例６】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（４５）

サブユニットの２０４番目のＶａｌをＴｒｐに置換するために、ｐＰＴ－ＤＢ１プラスミドＤＮＡを鋳型として、実施例１と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。 30
実施例１で調製したｐＰＴ－ＤＢ１のプラスミドＤＮＡ１０ｎｇを各々鋳型として２種類のＰＣＲ反応を行った。ＰＣＲ反応Ｎｏ．１は、配列表の配列番号：４６記載のプライマー及びＭ１３プライマーＭ４（配列表の配列番号：８に配列を記載）を各々５０ｐｍｏｌ含む全量５０μＬの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（９８）１５秒、アニーリング（５５）３０秒、伸長反応（７２）１２０秒の条件を２５サイクル繰り返すことにより行った。ＰＣＲ反応Ｎｏ．２は、ＭＵＴ４プライマー（配列表の配列番号：９に配列を記載）及びＭ１３プライマーＲＶ（配列表の配列番号：１０に配列を記載）を各々５０ｐｍｏｌ含む全量５０μＬの系（組成はキットに記載の条件による）で、ＰＣＲ反応Ｎｏ．１と同様の操作により行った。ＰＣＲ反応Ｎｏ．１及びＮｏ．２の反応終了液各５μＬを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度１．０重量％）によりＤＮＡ 40
増幅産物の分析を行ったところ、増幅ＤＮＡ産物の存在が確認できた。
以後、実施例１と全く同じ操作により、形質転換体Ｎｏ．４５を得た。

【０２２６】

次に、参考例１と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は１００％であった。

【０２２７】

また、上記菌体からアルカリＳＤＳ抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ＡＢＩ社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー３７３Ａを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表４５に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのサブユニットの２０４番目のＶａｌがＴ 50

r p に置換されている事を確認した。

【 0 2 2 8 】

【 表 4 5 】

表 4 5

クローン番号	変異箇所 (α サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 45	α -204番目	V a l	T r p	G T C	T G G

10

【 実施例 7 】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (4 6)

サブユニットの 2 0 4 番目の V a l を T h r に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【 0 2 2 9 】

実施例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 1 0 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：4 7 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号：8 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (9 8) 1 5 秒、アニーリング (5 5) 3 0 秒、伸長反応 (7 2) 1 2 0 秒の条件を 2 5 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 No. 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号：9 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号：1 0 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 No. 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1 . 0 重量 %) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 4 6 を得た。

20

【 0 2 3 0 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 1 0 0 % であった。

30

【 0 2 3 1 】

また、上記菌体からアルカリ S D S 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 4 6 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのサブユニットの 2 0 4 番目の V a l が T h r に置換されている事を確認した。

【 0 2 3 2 】

【 表 4 6 】

表 4 6

クローン番号	変異箇所 (α サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 46	α -204番目	V a l	T h r	G T C	A C C

40

【 実施例 8 】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (4 7)

サブユニットの 1 0 番目の T h r を A s p に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【 0 2 3 3 】

50

実施例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド D N A 1 0 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 N o . 1 は、配列表の配列番号： 4 8 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号： 8 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (9 8) 1 5 秒、アニーリング (5 5) 3 0 秒、伸長反応 (7 2) 1 2 0 秒の条件を 2 5 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 N o . 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号： 9 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号： 1 0 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 N o . 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 N o . 1 及び N o . 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1 . 0 重量 %) により D N A 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 D N A 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 N o . 4 7 を得た。

10

【 0 2 3 4 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 1 0 0 % であった。

【 0 2 3 5 】

また、上記菌体からアルカリ S D S 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 4 7 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのサブユニットの 1 0 番目の T h r が A s p に置換されている事を確認した。

20

【 0 2 3 6 】

【 表 4 7 】

表 4 7

クローン番号	変異箇所 (β サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
N o . 4 7	β - 1 0 番目	T h r	A s p	A C C	G A C

30

【 実施例 9 】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (4 8)

サブユニットの 1 0 番目の T h r を G l u に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド D N A を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【 0 2 3 7 】

実施例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド D N A 1 0 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 N o . 1 は、配列表の配列番号： 4 9 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号： 8 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (9 8) 1 5 秒、アニーリング (5 5) 3 0 秒、伸長反応 (7 2) 1 2 0 秒の条件を 2 5 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 N o . 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号： 9 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号： 1 0 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 N o . 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 N o . 1 及び N o . 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1 . 0 重量 %) により D N A 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 D N A 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 N o . 4 8 を得た。

40

【 0 2 3 8 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 1 0 0 % であった。

50

【 0 2 3 9 】

また、上記菌体からアルカリ S D S 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 4 8 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのサブユニットの 1 0 番目の T h r が G l u に置換されている事を確認した。

【 0 2 4 0 】

【表 4 8】

表 4 8

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 4 8	β-10 番目	T h r	G l u	A C C	G A A

10

[実施例 1 0] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (4 9)

サブユニットの 1 0 番目の T h r を T r p に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【 0 2 4 1 】

20

実施例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 1 0 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号 : 5 0 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号 : 8 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (9 8) 1 5 秒、アニーリング (5 5) 3 0 秒、伸長反応 (7 2) 1 2 0 秒の条件を 2 5 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 No. 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号 : 9 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号 : 1 0 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 No. 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1 . 0 重量 %) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 4 9 を得た。

30

【 0 2 4 2 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 1 0 0 % であった。

【 0 2 4 3 】

また、上記菌体からアルカリ S D S 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 4 9 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのサブユニットの 1 0 番目の T h r が T r p に置換されている事を確認した。

40

【 0 2 4 4 】

【表 4 9】

表 4 9

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 49	β-10番目	Thr	Trp	ACC	TGG

〔実施例 11〕ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (50)

サブユニットの 10 番目の Thr を Gly に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0245】

実施例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：51 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号：8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μL の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98) 15 秒、アニーリング (55) 30 秒、伸長反応 (72) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号：9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号：10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μL の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μL を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 50 を得た。

【0246】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0247】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 50 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのサブユニットの 10 番目の Thr が Gly に置換されている事を確認した。

【0248】

【表 50】

表 50

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 50	β-10番目	Thr	Gly	ACC	GGC

〔実施例 12〕ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (51)

サブユニットの 10 番目の Thr を Tyr に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0249】

実施例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：52 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号：8 に配列を記載) を各々 50 pmol

含む全量 50 μ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98）15 秒、アニーリング（55）30 秒、伸長反応（72）120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー（配列表の配列番号：9 に配列を記載）及び M13 プライマー RV（配列表の配列番号：10 に配列を記載）を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1.0 重量％）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 51 を得た。

【0250】

10

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100 % であった。

【0251】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 51 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのサブユニットの 10 番目の Thr が Tyr に置換されている事を確認した。

【0252】

【表 51】

20

表 51

クローン番号	変異箇所 (β サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 51	β -10 番目	Thr	Tyr	ACC	TAC

【実施例 13】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（52）

サブユニットの 10 番目の Thr を Cys に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

30

【0253】

実施例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：53 記載のプライマー及び M13 プライマー M4（配列表の配列番号：8 に配列を記載）を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98）15 秒、アニーリング（55）30 秒、伸長反応（72）120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー（配列表の配列番号：9 に配列を記載）及び M13 プライマー RV（配列表の配列番号：10 に配列を記載）を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1.0 重量％）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 52 を得た。

40

【0254】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100 % であった。

【0255】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法

50

によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 5 2 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの サブユニットの 1 0 番目の T h r が C y s に置換されている事を確認した。

【 0 2 5 6 】

【表 5 2 】

表 5 2

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 5 2	β-10番目	T h r	C y s	A C C	T G C

10

[実施例 1 4] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (5 3)

サブユニットの 3 2 番目の V a l を G l y に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【 0 2 5 7 】

実施例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 1 0 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号 : 5 4 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号 : 8 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (9 8) 1 5 秒、アニーリング (5 5) 3 0 秒、伸長反応 (7 2) 1 2 0 秒の条件を 2 5 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 No. 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号 : 9 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号 : 1 0 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 No. 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1 . 0 重量 %) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 5 3 を得た。

20

【 0 2 5 8 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 1 0 0 % であった。

30

【 0 2 5 9 】

また、上記菌体からアルカリ S D S 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 5 3 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの サブユニットの 3 2 番目の V a l が G l y に置換されている事を確認した。

【 0 2 6 0 】

【表 5 3 】

表 5 3

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 5 3	β-32番目	V a l	G l y	G T C	G G C

40

[実施例 1 5] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (5 4)

サブユニットの 3 7 番目の P h e を T h r に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド

50

ドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0261】

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No.1は、配列表の配列番号：55記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98）15秒、アニーリング（55）30秒、伸長反応（72）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No.2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No.1と同様の操作により行った。PCR反応No.1及びNo.2の反応終了液各5μLを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No.54を得た。

10

【0262】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0263】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表54に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼのサブユニットの37番目のPheがThrに置換されている事を確認した。

20

【0264】

【表54】

表54

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 54	β-37番目	Phe	Thr	TTC	ACC

30

【実施例16】ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（55）

サブユニットの37番目のPheをAlaに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0265】

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No.1は、配列表の配列番号：56記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98）15秒、アニーリング（55）30秒、伸長反応（72）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No.2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No.1と同様の操作により行った。PCR反応No.1及びNo.2の反応終了液各5μLを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No.55を得た。

40

【0266】

50

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100%であった。

【0267】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 55 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの サブユニットの 37 番目の Phe が Ala に置換されている事を確認した。

【0268】

【表 55】

10

表 55

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 55	β-37 番目	Phe	Ala	TTC	GCC

[実施例 17] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (56)

サブユニットの 37 番目の Phe を Leu に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

20

【0269】

実施例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：57 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号：8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μL の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98) 15 秒、アニーリング (55) 30 秒、伸長反応 (72) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号：9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号：10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μL の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μL を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 56 を得た。

30

【0270】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100%であった。

【0271】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 56 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの サブユニットの 37 番目の Phe が Leu に置換されている事を確認した。

40

【0272】

【表 56】

表 5 6

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 56	β-37番目	P h e	L e u	T T C	C T C

[実施例 18] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (5 7)

サブユニットの 37 番目の P h e を I l e に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【 0 2 7 3 】

実施例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 10 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号 : 58 記載のプライマー及び M 13 プライマー M 4 (配列表の配列番号 : 8 に配列を記載) を各々 50 p m o l 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98) 15 秒、アニーリング (55) 30 秒、伸長反応 (72) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 No. 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号 : 9 に配列を記載) 及び M 13 プライマー R V (配列表の配列番号 : 10 に配列を記載) を各々 50 p m o l 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 No. 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量 %) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 57 を得た。

【 0 2 7 4 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100 % であった。

【 0 2 7 5 】

また、上記菌体からアルカリ S D S 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 57 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのサブユニットの 37 番目の P h e が I l e に置換されている事を確認した。

【 0 2 7 6 】

【 表 5 7 】

表 5 7

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 57	β-37番目	P h e	I l e	T T C	A T C

[実施例 19] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (5 8)

サブユニットの 37 番目の P h e を V a l に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【 0 2 7 7 】

実施例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 10 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号 : 59 記載のプライマー及び M 13 プライマー M 4 (配列表の配列番号 : 8 に配列を記載) を各々 50 p m o l

含む全量 50 μ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98）15 秒、アニーリング（55）30 秒、伸長反応（72）120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー（配列表の配列番号：9 に配列を記載）及び M13 プライマー RV（配列表の配列番号：10 に配列を記載）を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1.0 重量%）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 58 を得た。

【0278】

10

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0279】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 58 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのサブユニットの 37 番目の Phe が Val に置換されている事を確認した。

【0280】

20

【表 58】

表 58

クローン番号	変異箇所 (β サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 58	β -37 番目	Phe	Val	TTC	GTC

【実施例 20】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（59）

30

サブユニットの 41 番目の Phe を Glu に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0281】

実施例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：60 記載のプライマー及び M13 プライマー M4（配列表の配列番号：8 に配列を記載）を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98）15 秒、アニーリング（55）30 秒、伸長反応（72）120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー（配列表の配列番号：9 に配列を記載）及び M13 プライマー RV（配列表の配列番号：10 に配列を記載）を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1.0 重量%）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 59 を得た。

40

【0282】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0283】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法

50

によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 5 9 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのサブユニットの 4 1 番目の P h e が G l u に置換されている事を確認した。

【 0 2 8 4 】

【表 5 9 】

表 5 9

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 5 9	β-4 1 番目	P h e	G l u	T T C	G A A

10

[実施例 2 1] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (6 0)

サブユニットの 4 1 番目の P h e を T h r に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【 0 2 8 5 】

実施例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 1 0 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号 : 6 1 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号 : 8 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (9 8) 1 5 秒、アニーリング (5 5) 3 0 秒、伸長反応 (7 2) 1 2 0 秒の条件を 2 5 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 No. 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号 : 9 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号 : 1 0 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 No. 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1 . 0 重量 %) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 6 0 を得た。

20

【 0 2 8 6 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 1 0 0 % であった。

30

【 0 2 8 7 】

また、上記菌体からアルカリ S D S 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 6 0 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのサブユニットの 4 1 番目の P h e が T h r に置換されている事を確認した。

【 0 2 8 8 】

【表 6 0 】

40

表 6 0

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 6 0	β-4 1 番目	P h e	T h r	T T C	A C C

[実施例 2 2] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (6 1)

サブユニットの 4 1 番目の P h e を A l a に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

50

ドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0289】

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No.1は、配列表の配列番号：62記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98）15秒、アニーリング（55）30秒、伸長反応（72）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No.2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No.1と同様の操作により行った。PCR反応No.1及びNo.2の反応終了液各5μLを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No.61を得た。

10

【0290】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0291】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表61に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのサブユニットの41番目のPheがAlaに置換されている事を確認した。

20

【0292】

【表61】

表61

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 61	β-41番目	Phe	Ala	TTC	GCC

30

[実施例23] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(62)

サブユニットの41番目のPheをLeuに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0293】

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No.1は、配列表の配列番号：63記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98）15秒、アニーリング（55）30秒、伸長反応（72）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No.2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No.1と同様の操作により行った。PCR反応No.1及びNo.2の反応終了液各5μLを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No.62を得た。

40

【0294】

50

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100%であった。

【0295】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 62 に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼのサブユニットの 41 番目の Phe が Leu に置換されている事を確認した。

【0296】

【表 62】

10

表 62

クローン番号	変異箇所 (β サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 62	β -41 番目	Phe	Leu	TTC	CTC

【実施例 24】ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (63)

サブユニットの 41 番目の Phe を Ile に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0297】

実施例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：64 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号：8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98) 15 秒、アニーリング (55) 30 秒、伸長反応 (72) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号：9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号：10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 63 を得た。

【0298】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100%であった。

【0299】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 63 に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼのサブユニットの 41 番目の Phe が Ile に置換されている事を確認した。

【0300】

【表 63】

40

表 6 3

クローン番号	変異箇所 (β サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 63	β -41番目	Phe	Ile	TTC	ATC

[実施例 25] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (64)

サブユニットの 41 番目の Phe を Val に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【 0301 】

実施例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：65 記載のプライマー及び M 13 プライマー M 4 (配列表の配列番号：8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98) 15 秒、アニーリング (55) 30 秒、伸長反応 (72) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 No. 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号：9 に配列を記載) 及び M 13 プライマー R V (配列表の配列番号：10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 No. 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量 %) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 64 を得た。

【 0302 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100 % であった。

【 0303 】

また、上記菌体からアルカリ S D S 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 6 4 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのサブユニットの 41 番目の Phe が Val に置換されている事を確認した。

【 0304 】

【 表 6 4 】

表 6 4

クローン番号	変異箇所 (β サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 64	β -41番目	Phe	Val	TTC	GTC

[実施例 26] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (65)

サブユニットの 46 番目の Met を Gly に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【 0305 】

実施例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：66 記載のプライマー及び M 13 プライマー M 4 (配列表の配列番号：8 に配列を記載) を各々 50 pmol

含む全量 50 μ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98）15 秒、アニーリング（55）30 秒、伸長反応（72）120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー（配列表の配列番号：9 に配列を記載）及び M13 プライマー RV（配列表の配列番号：10 に配列を記載）を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1.0 重量%）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 65 を得た。

【0306】

10

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0307】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 65 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのサブユニットの 46 番目の Met が Gly に置換されている事を確認した。

【0308】

20

【表 65】

表 65

クローン番号	変異箇所 (β サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 65	β -46 番目	Met	Gly	ATG	GGG

【実施例 27】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（66）

30

サブユニットの 46 番目の Met を Tyr に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0309】

実施例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：67 記載のプライマー及び M13 プライマー M4（配列表の配列番号：8 に配列を記載）を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98）15 秒、アニーリング（55）30 秒、伸長反応（72）120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー（配列表の配列番号：9 に配列を記載）及び M13 プライマー RV（配列表の配列番号：10 に配列を記載）を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1.0 重量%）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 66 を得た。

40

【0310】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0311】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法

50

によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 6 6 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの サブユニットの 4 6 番目の M e t が T y r に置換されている事を確認した。

【 0 3 1 2 】

【表 6 6 】

表 6 6

クローン番号	変異箇所 (β サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 6 6	β - 4 6 番目	M e t	T y r	A T G	T A T

10

[実施例 2 8] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (6 7)

サブユニットの 4 6 番目の M e t を L e u に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【 0 3 1 3 】

実施例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 1 0 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号 : 6 8 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号 : 8 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (9 8) 1 5 秒、アニーリング (5 5) 3 0 秒、伸長反応 (7 2) 1 2 0 秒の条件を 2 5 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 No. 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号 : 9 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号 : 1 0 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 No. 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1 . 0 重量 %) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 6 7 を得た。

20

【 0 3 1 4 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 1 0 0 % であった。

30

【 0 3 1 5 】

また、上記菌体からアルカリ S D S 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 6 7 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの サブユニットの 4 6 番目の M e t が L e u に置換されている事を確認した。

【 0 3 1 6 】

【表 6 7 】

40

表 6 7

クローン番号	変異箇所 (β サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 6 7	β - 4 6 番目	M e t	L e u	A T G	C T G

[実施例 2 9] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (6 8)

サブユニットの 4 6 番目の M e t を L y s に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

50

ドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0317】

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No.1は、配列表の配列番号：69記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98）15秒、アニーリング（55）30秒、伸長反応（72）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No.2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No.1と同様の操作により行った。PCR反応No.1及びNo.2の反応終了液各5μLを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No.68を得た。

10

【0318】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0319】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表68に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼのサブユニットの46番目のMetがLysに置換されている事を確認した。

20

【0320】

【表68】

表68

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 68	β-46番目	Met	Lys	ATG	AAG

30

[実施例30] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（69）

サブユニットの46番目のMetをAspに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0321】

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No.1は、配列表の配列番号：70記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98）15秒、アニーリング（55）30秒、伸長反応（72）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No.2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No.1と同様の操作により行った。PCR反応No.1及びNo.2の反応終了液各5μLを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No.69を得た。

40

【0322】

50

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100%であった。

【0323】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 69 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのサブユニットの 46 番目の Met が Asp に置換されている事を確認した。

【0324】

【表 69】

10

表 69

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 69	β-46 番目	Met	Asp	ATG	GAT

[実施例 31] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (70)

20

サブユニットの 48 番目の Leu を Gly に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0325】

実施例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：71 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号：8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μL の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98) 15 秒、アニーリング (55) 30 秒、伸長反応 (72) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号：9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号：10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μL の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μL を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 70 を得た。

30

【0326】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100%であった。

【0327】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 70 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのサブユニットの 48 番目の Leu が Gly に置換されている事を確認した。

40

【0328】

【表 70】

表 7 0

クローン番号	変異箇所 (β サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 70	β -48番目	Leu	Gly	CTG	GGG

[実施例 3 2] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (7 1)

サブユニットの 4 8 番目の Leu を Ala に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【 0 3 2 9 】

実施例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 1 0 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号 : 7 2 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号 : 8 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (9 8) 1 5 秒、アニーリング (5 5) 3 0 秒、伸長反応 (7 2) 1 2 0 秒の条件を 2 5 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 No. 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号 : 9 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号 : 1 0 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 No. 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1 . 0 重量 %) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 7 1 を得た。

【 0 3 3 0 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 1 0 0 % であった。

【 0 3 3 1 】

また、上記菌体からアルカリ S D S 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 7 1 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのサブユニットの 4 8 番目の Leu が Ala に置換されている事を確認した。

【 0 3 3 2 】

【 表 7 1 】

表 7 1

クローン番号	変異箇所 (β サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 71	β -48番目	Leu	Ala	CTG	GCG

[実施例 3 3] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (7 2)

サブユニットの 4 8 番目の Leu を Val に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【 0 3 3 3 】

実施例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 1 0 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号 : 7 3 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号 : 8 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l

含む全量 50 μ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98）15 秒、アニーリング（55）30 秒、伸長反応（72）120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー（配列表の配列番号：9 に配列を記載）及び M13 プライマー RV（配列表の配列番号：10 に配列を記載）を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1.0 重量％）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 72 を得た。

【0334】

10

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100 % であった。

【0335】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 72 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのサブユニットの 48 番目の Leu が Val に置換されている事を確認した。

【0336】

20

【表 72】

表 72

クローン番号	変異箇所 (β サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 72	β -48 番目	Leu	Val	CTG	GTG

【実施例 34】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（73）

30

サブユニットの 48 番目の Leu を Ser に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0337】

実施例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：74 記載のプライマー及び M13 プライマー M4（配列表の配列番号：8 に配列を記載）を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98）15 秒、アニーリング（55）30 秒、伸長反応（72）120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー（配列表の配列番号：9 に配列を記載）及び M13 プライマー RV（配列表の配列番号：10 に配列を記載）を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1.0 重量％）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 73 を得た。

40

【0338】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100 % であった。

【0339】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法

50

によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 7 3 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの サブユニットの 4 8 番目の L e u が S e r に置換されている事を確認した。

【 0 3 4 0 】

【表 7 3 】

表 7 3

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 7 3	β-4 8 番目	L e u	S e r	CTG	TCG

10

[実施例 3 5] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (7 4)

サブユニットの 4 8 番目の L e u を T h r に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【 0 3 4 1 】

実施例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 1 0 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号 : 7 5 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号 : 8 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (9 8) 1 5 秒、アニーリング (5 5) 3 0 秒、伸長反応 (7 2) 1 2 0 秒の条件を 2 5 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 No. 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号 : 9 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号 : 1 0 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 No. 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1 . 0 重量 %) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 7 4 を得た。

20

【 0 3 4 2 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 1 0 0 % であった。

30

【 0 3 4 3 】

また、上記菌体からアルカリ S D S 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 7 4 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの サブユニットの 4 8 番目の L e u が T h r に置換されている事を確認した。

【 0 3 4 4 】

【表 7 4 】

40

表 7 4

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 7 4	β-4 8 番目	L e u	T h r	CTG	ACG

[実施例 3 6] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (7 5)

サブユニットの 4 8 番目の L e u を A r g に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド

50

ドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0345】

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No.1は、配列表の配列番号：76記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98）15秒、アニーリング（55）30秒、伸長反応（72）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No.2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No.1と同様の操作により行った。PCR反応No.1及びNo.2の反応終了液各5μLを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No.75を得た。

10

【0346】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0347】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表75に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのサブユニットの48番目のLeuがArgに置換されている事を確認した。

20

【0348】

【表75】

表75

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 75	β-48番目	Leu	Arg	CTG	CGG

30

〔実施例37〕ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（76）

サブユニットの51番目のPheをAlaに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0349】

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No.1は、配列表の配列番号：77記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98）15秒、アニーリング（55）30秒、伸長反応（72）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No.2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No.1と同様の操作により行った。PCR反応No.1及びNo.2の反応終了液各5μLを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No.76を得た。

40

【0350】

50

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100%であった。

【0351】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 76 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの サブユニットの 51 番目の Phe が Ala に置換されている事を確認した。

【0352】

【表 76】

10

表 76

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 76	β-51 番目	Phe	Ala	TTC	GCC

【実施例 38】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (77)

サブユニットの 51 番目の Phe を Val に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0353】

実施例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：78 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号：8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μL の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98) 15 秒、アニーリング (55) 30 秒、伸長反応 (72) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号：9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号：10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μL の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μL を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 77 を得た。

【0354】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100%であった。

【0355】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 77 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの サブユニットの 51 番目の Phe が Val に置換されている事を確認した。

【0356】

【表 77】

40

表 7 7

クローン番号	変異箇所 (β サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 77	β -51番目	P h e	V a l	T T C	G T C

[実施例 39] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (7 8)

サブユニットの 7 2 番目の T r p を P h e に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【 0 3 5 7 】

実施例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 1 0 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号 : 7 9 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号 : 8 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (9 8) 1 5 秒、アニーリング (5 5) 3 0 秒、伸長反応 (7 2) 1 2 0 秒の条件を 2 5 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 No. 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号 : 9 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号 : 1 0 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 No. 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1 . 0 重量 %) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 7 8 を得た。

【 0 3 5 8 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 1 0 0 % であった。

【 0 3 5 9 】

また、上記菌体からアルカリ S D S 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 7 8 に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼのサブユニットの 7 2 番目の T r p が P h e に置換されている事を確認した。

【 0 3 6 0 】

【 表 7 8 】

表 7 8

クローン番号	変異箇所 (β サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 78	β -72番目	T r p	P h e	T G G	T T T

[実施例 40] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (7 9)

サブユニットの 1 1 8 番目の P h e を A l a に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【 0 3 6 1 】

実施例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 1 0 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号 : 8 0 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号 : 8 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l

含む全量 50 μ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98）15 秒、アニーリング（55）30 秒、伸長反応（72）120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー（配列表の配列番号：9 に配列を記載）及び M13 プライマー RV（配列表の配列番号：10 に配列を記載）を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1.0 重量％）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 79 を得た。

【0362】

10

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100 % であった。

【0363】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 79 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのサブユニットの 118 番目の Phe が Ala に置換されている事を確認した。

【0364】

20

【表 79】

表 79

クローン番号	変異箇所 (β サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 79	β -118 番目	Phe	Ala	TTC	GCC

【実施例 41】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（80）

30

サブユニットの 118 番目の Phe を Leu に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0365】

実施例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：81 記載のプライマー及び M13 プライマー M4（配列表の配列番号：8 に配列を記載）を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98）15 秒、アニーリング（55）30 秒、伸長反応（72）120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー（配列表の配列番号：9 に配列を記載）及び M13 プライマー RV（配列表の配列番号：10 に配列を記載）を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1.0 重量％）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 80 を得た。

40

【0366】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100 % であった。

【0367】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法

50

によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 8 0 に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの サブユニットの 1 1 8 番目の P h e が L e u に置換されている事を確認した。

【 0 3 6 8 】

【表 8 0 】

表 8 0

クローン番号	変異箇所 (β サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 8 0	β -1 1 8 番目	P h e	L e u	T T C	C T C

10

[実施例 4 2] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (8 1)

サブユニットの 1 1 8 番目の P h e を I l e に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【 0 3 6 9 】

実施例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 1 0 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号 : 8 2 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号 : 8 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (9 8) 1 5 秒、アニーリング (5 5) 3 0 秒、伸長反応 (7 2) 1 2 0 秒の条件を 2 5 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 No. 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号 : 9 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号 : 1 0 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 No. 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1 . 0 重量 %) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 8 1 を得た。

20

【 0 3 7 0 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 1 0 0 % であった。

30

【 0 3 7 1 】

また、上記菌体からアルカリ S D S 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 8 1 に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの サブユニットの 1 1 8 番目の P h e が I l e に置換されている事を確認した。

【 0 3 7 2 】

【表 8 1 】

40

表 8 1

クローン番号	変異箇所 (β サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 8 1	β -1 1 8 番目	P h e	I l e	T T C	A T C

[実施例 4 3] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (8 2)

サブユニットの 1 1 8 番目の P h e を V a l に置換するために、p P T - D B 1 プラス

50

ミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0373】

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No.1は、配列表の配列番号：83記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98）15秒、アニーリング（55）30秒、伸長反応（72）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No.2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No.1と同様の操作により行った。PCR反応No.1及びNo.2の反応終了液各5μLを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No.82を得た。

10

【0374】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0375】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表82に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼのサブユニットの118番目のPheがValに置換されている事を確認した。

20

【0376】

【表82】

表82

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 82	β-118番目	Phe	Val	TTC	GTC

30

[実施例44] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(83)

サブユニットの127番目のLeuをAlaに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0377】

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No.1は、配列表の配列番号：84記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98）15秒、アニーリング（55）30秒、伸長反応（72）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No.2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No.1と同様の操作により行った。PCR反応No.1及びNo.2の反応終了液各5μLを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No.83を得た。

40

【0378】

50

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100%であった。

【0379】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 83 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのサブユニットの 127 番目の Leu が Ala に置換されている事を確認した。

【0380】

【表 83】

10

表 83

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 83	β-127 番目	Leu	Ala	CTG	GCG

[実施例 45] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (84)

サブユニットの 127 番目の Leu を Val に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0381】

実施例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：85 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号：8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μL の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98) 15 秒、アニーリング (55) 30 秒、伸長反応 (72) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号：9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号：10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μL の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μL を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 84 を得た。

【0382】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100%であった。

【0383】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 84 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのサブユニットの 127 番目の Leu が Val に置換されている事を確認した。

【0384】

【表 84】

40

表 8 4

クローン番号	変異箇所 (β サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 84	β -127番目	Leu	Val	CTG	GTG

[実施例 4 6] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (8 5)

サブユニットの 1 2 7 番目の Leu を Ser に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【 0 3 8 5 】

実施例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 1 0 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号 : 8 6 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号 : 8 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (9 8) 1 5 秒、アニーリング (5 5) 3 0 秒、伸長反応 (7 2) 1 2 0 秒の条件を 2 5 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 No. 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号 : 9 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号 : 1 0 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 No. 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1 . 0 重量 %) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 8 5 を得た。

【 0 3 8 6 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 1 0 0 % であった。

【 0 3 8 7 】

また、上記菌体からアルカリ S D S 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 8 5 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのサブユニットの 1 2 7 番目の Leu が Ser に置換されている事を確認した。

【 0 3 8 8 】

【 表 8 5 】

表 8 5

クローン番号	変異箇所 (β サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 85	β -127番目	Leu	Ser	CTG	TCG

[実施例 4 7] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (8 6)

サブユニットの 1 4 6 番目の Arg を Gly に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【 0 3 8 9 】

実施例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 1 0 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号 : 8 7 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号 : 8 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l

含む全量 50 μ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98）15 秒、アニーリング（55）30 秒、伸長反応（72）120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー（配列表の配列番号：9 に配列を記載）及び M13 プライマー RV（配列表の配列番号：10 に配列を記載）を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1.0 重量％）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 86 を得た。

【0390】

10

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100 % であった。

【0391】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 86 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのサブユニットの 146 番目の Arg が Gly に置換されている事を確認した。

【0392】

20

【表 86】

表 86

クローン番号	変異箇所 (β サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 86	β -146 番目	Arg	Gly	CGG	GGG

【実施例 48】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（87）

サブユニットの 160 番目の Arg を Leu に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

30

【0393】

実施例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：88 記載のプライマー及び M13 プライマー M4（配列表の配列番号：8 に配列を記載）を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98）15 秒、アニーリング（55）30 秒、伸長反応（72）120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー（配列表の配列番号：9 に配列を記載）及び M13 プライマー RV（配列表の配列番号：10 に配列を記載）を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1.0 重量％）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 87 を得た。

40

【0394】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100 % であった。

【0395】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法

50

によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 8 7 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの サブユニットの 1 6 0 番目の A r g が L e u に置換されている事を確認した。

【 0 3 9 6 】

【表 8 7 】

表 8 7

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 8 7	β-1 6 0 番目	A r g	L e u	C G G	C T G

10

[実施例 4 9] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (8 8)

サブユニットの 1 6 0 番目の A r g を T r p に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【 0 3 9 7 】

実施例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 1 0 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号 : 8 9 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号 : 8 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (9 8) 1 5 秒、アニーリング (5 5) 3 0 秒、伸長反応 (7 2) 1 2 0 秒の条件を 2 5 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 No. 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号 : 9 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号 : 1 0 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 No. 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1 . 0 重量 %) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 8 8 を得た。

20

【 0 3 9 8 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 1 0 0 % であった。

30

【 0 3 9 9 】

また、上記菌体からアルカリ S D S 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 8 8 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの サブユニットの 1 6 0 番目の A r g が T r p に置換されている事を確認した。

【 0 4 0 0 】

【表 8 8 】

表 8 8

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 8 8	β-1 6 0 番目	A r g	T r p	C G G	T G G

40

[実施例 5 0] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (8 9)

サブユニットの 1 8 6 番目の L e u を G l u に置換するために、p P T - D B 1 プラス

50

ミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0401】

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No.1は、配列表の配列番号：90記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98）15秒、アニーリング（55）30秒、伸長反応（72）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No.2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No.1と同様の操作により行った。PCR反応No.1及びNo.2の反応終了液各5μLを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No.89を得た。

10

【0402】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0403】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表89に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼのサブユニットの186番目のLeuがGluに置換されている事を確認した。

20

【0404】

【表89】

表89

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 89	β-186番目	Leu	Glu	CTG	GAG

30

【実施例51】ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（90）

サブユニットの186番目のLeuをAspに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0405】

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No.1は、配列表の配列番号：91記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98）15秒、アニーリング（55）30秒、伸長反応（72）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No.2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No.1と同様の操作により行った。PCR反応No.1及びNo.2の反応終了液各5μLを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No.90を得た。

40

【0406】

50

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100%であった。

【0407】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 90 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのサブユニットの 186 番目の Leu が Asp に置換されている事を確認した。

【0408】

【表 90】

10

表 90

クローン番号	変異箇所 (β サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 90	β -186 番目	Leu	Asp	CTG	GAT

【実施例 52】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (91)

サブユニットの 186 番目の Leu を Lys に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0409】

実施例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：92 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号：8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98) 15 秒、アニーリング (55) 30 秒、伸長反応 (72) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号：9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号：10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 91 を得た。

【0410】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100%であった。

【0411】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 91 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのサブユニットの 186 番目の Leu が Lys に置換されている事を確認した。

【0412】

【表 91】

40

表 9 1

クローン番号	変異箇所 (β サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 91	β -186番目	Leu	Lys	CTG	AAG

[実施例 5 3] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (9 2)

サブユニットの 1 8 6 番目の Leu を Arg に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【 0 4 1 3 】

実施例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 1 0 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号 : 9 3 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号 : 8 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (9 8) 1 5 秒、アニーリング (5 5) 3 0 秒、伸長反応 (7 2) 1 2 0 秒の条件を 2 5 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 No. 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号 : 9 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号 : 1 0 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 No. 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1 . 0 重量 %) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 9 2 を得た。

【 0 4 1 4 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 1 0 0 % であった。

【 0 4 1 5 】

また、上記菌体からアルカリ S D S 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 9 2 に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼのサブユニットの 1 8 6 番目の Leu が Arg に置換されている事を確認した。

【 0 4 1 6 】

【 表 9 2 】

表 9 2

クローン番号	変異箇所 (β サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 92	β -186番目	Leu	Arg	CTG	CGG

[実施例 5 4] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (9 3)

サブユニットの 1 8 6 番目の Leu を Asn に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【 0 4 1 7 】

実施例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 1 0 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号 : 9 4 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号 : 8 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l

含む全量 50 μ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98）15 秒、アニーリング（55）30 秒、伸長反応（72）120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー（配列表の配列番号：9 に配列を記載）及び M13 プライマー RV（配列表の配列番号：10 に配列を記載）を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1.0 重量%）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 93 を得た。

【0418】

10

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0419】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 93 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのサブユニットの 186 番目の Leu が Asn に置換されている事を確認した。

【0420】

20

【表 93】

表 93

クローン番号	変異箇所 (β サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 93	β -186 番目	Leu	Asn	CTG	AAC

【実施例 55】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（94）

30

サブユニットの 186 番目の Leu を Ser に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0421】

実施例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：95 記載のプライマー及び M13 プライマー M4（配列表の配列番号：8 に配列を記載）を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98）15 秒、アニーリング（55）30 秒、伸長反応（72）120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー（配列表の配列番号：9 に配列を記載）及び M13 プライマー RV（配列表の配列番号：10 に配列を記載）を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1.0 重量%）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 94 を得た。

40

【0422】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0423】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法

50

によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 9 4 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの サブユニットの 1 8 6 番目の L e u が S e r に置換されている事を確認した。

【 0 4 2 4 】

【表 9 4 】

表 9 4

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 9 4	β-186 番目	L e u	S e r	CTG	TCG

10

【実施例 5 6】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (9 5)

サブユニットの 1 8 6 番目の L e u を G l y に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【 0 4 2 5 】

実施例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 1 0 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：9 6 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号：8 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (9 8) 1 5 秒、アニーリング (5 5) 3 0 秒、伸長反応 (7 2) 1 2 0 秒の条件を 2 5 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 No. 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号：9 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号：1 0 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 No. 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1 . 0 重量 %) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 9 5 を得た。

20

【 0 4 2 6 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 1 0 0 % であった。

30

【 0 4 2 7 】

また、上記菌体からアルカリ S D S 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 9 5 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの サブユニットの 1 8 6 番目の L e u が G l y に置換されている事を確認した。

【 0 4 2 8 】

【表 9 5 】

40

表 9 5

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 9 5	β-186 番目	L e u	G l y	CTG	GGG

【実施例 5 7】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (9 6)

サブユニットの 2 1 7 番目の A s p を G l y に置換するために、p P T - D B 1 プラス

50

ミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0429】

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No.1は、配列表の配列番号：97記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98）15秒、アニーリング（55）30秒、伸長反応（72）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No.2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No.1と同様の操作により行った。PCR反応No.1及びNo.2の反応終了液各5μLを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No.96を得た。

10

【0430】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0431】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表96に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼのサブユニットの217番目のAspがGlyに置換されている事を確認した。

20

【0432】

【表96】

表96

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 96	β-217番目	Asp	Gly	GAC	GGC

30

【実施例58】ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（97）

クローンNo.40のアミノ酸変異（サブユニットの36番目：ThrがMet）とクローンNo.11のアミノ酸変異（サブユニットの126番目：PheがTyr）を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認した。

【0433】

30mlの試験管に10mlのLB液体培地を調製し、121・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100μg/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、参考例11で得られたクローンNo.11を一白金耳植菌し、37・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離（15000rpm×5分）により菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりプラスミドDNAを調製した。

40

【0434】

調製したプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No.1は、配列表の配列番号：41記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98）15秒、アニーリング（55）3

50

0 秒、伸長反応 (7 2) 1 2 0 秒の条件を 2 5 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 N o . 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号 : 9 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号 : 1 0 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 N o . 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 N o . 1 および N o . 2 の反応終了液各 5 μ l を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1 . 0 重量 %) により D N A 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 D N A 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 N o . 9 7 を得た。

【 0 4 3 5 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 1 0 0 % であった。 10

【 0 4 3 6 】

また、上記菌体からアルカリ S D S 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 9 7 に示したように野生型のニトリルヒドラーゼの サブユニットの 3 6 番目の T h r が M e t に、サブユニットの 1 2 6 番目の P h e が T y r にそれぞれ置換されていた。

【 0 4 3 7 】

【 表 9 7 】

表 9 7

20

クローン番号	変異箇所 (α サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
N o . 9 7	α - 3 6 番目 α - 1 2 6 番目	T h r P h e	M e t T y r	A C G T T C	A T G T A C

[実施例 5 9] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (9 8)
クローン N o . 4 2 のアミノ酸変異 (サブユニットの 1 4 8 番目 : G l y が A s p) と
クローン N o . 4 3 のアミノ酸変異 (サブユニットの 2 0 4 番目 : V a l が A r g) を
共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されているこ
ことを確認した。 30

【 0 4 3 8 】

3 0 m l の試験管に 1 0 m l の L B 液体培地を調製し、1 2 1 ・ 2 0 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が 1 0 0 μ g / m l となるようにアンピシリンを添加した後、実施例 4 で得られたクローン N o . 4 3 を一白金耳植菌し、3 7 ・ 3 0 0 r p m にて約 2 0 時間培養した。該培養液 1 m l を適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (1 5 0 0 0 r p m × 5 分) により菌体を分離した。続いてアルカリ S D S 抽出法により該菌体よりプラスミド D N A を調製した。 40

【 0 4 3 9 】

調製したプラスミド D N A 1 0 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 N o . 1 は、配列表の配列番号 : 4 3 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号 : 8 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (9 8) 1 5 秒、アニーリング (5 5) 3 0 秒、伸長反応 (7 2) 1 2 0 秒の条件を 2 5 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 N o . 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号 : 9 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号 : 1 0 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 N o . 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 N o . 1 および N o . 2 の反応終了液各 5 μ l を用いたアガ 50

ロース電気泳動（アガロース濃度 1 . 0 重量 % ）により D N A 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 D N A 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 N o . 9 8 を得た。

【 0 4 4 0 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 1 0 0 % であった。

【 0 4 4 1 】

また、上記菌体からアルカリ S D S 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 9 8 に示したように野生型のニトリルヒドラーゼの サブユニットの 1 4 番目の G l y が A s p に、 サブユニットの 2 0 4 番目の V a l が A r g にそれぞれ置換されていた。

【 0 4 4 2 】

【表 9 8】

表 9 8

クローン番号	変異箇所 (α サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
N o . 9 8	α -1 4 8 番目	G l y	A s p	G G C	G A C
	α -2 0 4 番目	V a l	A r g	G T C	C G C

〔実施例 6 0〕ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（9 9）

クローン N o . 7 7 のアミノ酸変異（ サブユニットの 5 1 番目：P h e が V a l ）とクローン N o . 2 0 のアミノ酸変異（ サブユニットの 1 0 8 番目：G l u が A s p ）を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

【 0 4 4 3 】

3 0 m l の試験管に 1 0 m l の L B 液体培地を調製し、1 2 1 . 2 0 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が 1 0 0 μ g / m l となるようにアンピシリンを添加した後、参考例 2 0 で得られたクローン N o . 2 0 を一白金耳植菌し、3 7 . 3 0 0 r p m にて約 2 0 時間培養した。該培養液 1 m l を適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離（1 5 0 0 0 r p m \times 5 分）により菌体を分離した。続いてアルカリ S D S 抽出法により該菌体よりプラスミド D N A を調製した。

【 0 4 4 4 】

調製したプラスミド D N A 1 0 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 N o . 1 は、配列表の配列番号：7 8 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4（配列表の配列番号：8 に配列を記載）を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ l の系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（9 8 . 0 ）1 5 秒、アニーリング（5 5 . 0 ）3 0 秒、伸長反応（7 2 . 0 ）1 2 0 秒の条件を 2 5 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 N o . 2 は、M U T 4 プライマー（配列表の配列番号：9 に配列を記載）及び M 1 3 プライマー R V（配列表の配列番号：1 0 に配列を記載）を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ l の系（組成はキットに記載の条件による）で、P C R 反応 N o . 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 N o . 1 および N o . 2 の反応終了液各 5 μ l を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1 . 0 重量 % ）により D N A 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 D N A 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 N o . 9 9 を得た。

【 0 4 4 5 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は

100%であった。

【0446】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表99に示したように野生型のニトリルヒドラターゼのサブユニットの51番目のPheがValに、サブユニットの108番目のGluがAspにそれぞれ置換されていた。

【0447】

【表99】

表99

10

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 99	β-51番目 β-108番目	Phe Glu	Val Asp	TTC GAG	GTC GAT

[参考例40] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(100) クローンNo. 20のアミノ酸変異(サブユニットの108番目: GluがAsp)とクローンNo. 30のアミノ酸変異(サブユニットの200番目: AlaがGlu)を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認した。

20

【0448】

30mlの試験管に10mlのLB液体培地を調製し、121・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100μg/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、参考例30で得られたクローンNo. 30を一白金耳植菌し、37・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離(15000rpm×5分)により菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりプラスミドDNAを調製した。

30

【0449】

調製したプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 29記載のプライマー及びM13プライマーM4(配列表の配列番号: 8に配列を記載)を各々50pmol含む全量50μlの系(組成はキットに記載の条件による)で、熱変性(98)15秒、アニーリング(55)30秒、伸長反応(72)120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー(配列表の配列番号: 9に配列を記載)及びM13プライマーRV(配列表の配列番号: 10に配列を記載)を各々50pmol含む全量50μlの系(組成はキットに記載の条件による)で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1およびNo. 2の反応終了液各5μlを用いたアガロース電気泳動(アガロース濃度1.0重量%)によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 100を得た。

40

【0450】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0451】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表100に

50

示したように野生型のニトリルヒドラーゼの サブユニットの108番目のGluがAspに、サブユニットの200番目のAlaがGluにそれぞれ置換されていた。

【0452】

【表100】

表100

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 100	β-108番目 β-200番目	Glu Ala	Asp Glu	GAG GCC	GAT GAC

10

【実施例61】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(101)
クローンNo. 82のアミノ酸変異(サブユニットの118番目:PheがVal)とクローンNo. 30のアミノ酸変異(サブユニットの200番目:AlaがGlu)を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

【0453】

30mlの試験管に10mlのLB液体培地を調製し、121・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100μg/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、参考例30で得られたクローンNo. 30を一白金耳植菌し、37・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離(15000rpm×5分)により菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりプラスミドDNAを調製した。

20

【0454】

調製したプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 83記載のプライマー及びM13プライマーM4(配列表の配列番号: 8に配列を記載)を各々50pmol含む全量50μlの系(組成はキットに記載の条件による)で、熱変性(98)15秒、アニーリング(55)30秒、伸長反応(72)120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー(配列表の配列番号: 9に配列を記載)及びM13プライマーRV(配列表の配列番号: 10に配列を記載)を各々50pmol含む全量50μlの系(組成はキットに記載の条件による)で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1およびNo. 2の反応終了液各5μlを用いたアガロース電気泳動(アガロース濃度1.0重量%)によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 101を得た。

30

【0455】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

40

【0456】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表101に示したように野生型のニトリルヒドラーゼのサブユニットの118番目のPheがValに、サブユニットの200番目のAlaがGluにそれぞれ置換されていた。

【0457】

【表101】

表101

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 101	β-118番目 β-200番目	Phe Ala	Val Glu	TTC GCC	GTC GAC

【実施例62】ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(102) クローンNo. 88のアミノ酸変異(サブユニットの160番目: ArgがTrp)とクローンNo. 92のアミノ酸変異(サブユニットの186番目: LeuがArg)を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認した。 10

【0458】

30mlの試験管に10mlのLB液体培地を調製し、121・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100μg/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、実施例53で得られたクローンNo. 92を一白金耳植菌し、37・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離(15000rpm×5分)により菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりプラスミドDNAを調製した。 20

【0459】

調製したプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 89記載のプライマー及びM13プライマーM4(配列表の配列番号: 8に配列を記載)を各々50pmol含む全量50μlの系(組成はキットに記載の条件による)で、熱変性(98)15秒、アニーリング(55)30秒、伸長反応(72)120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー(配列表の配列番号: 9に配列を記載)及びM13プライマーRV(配列表の配列番号: 10に配列を記載)を各々50pmol含む全量50μlの系(組成はキットに記載の条件による)で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1およびNo. 2の反応終了液各5μlを用いたアガロース電気泳動(アガロース濃度1.0重量%)によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 102を得た。 30

【0460】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0461】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表102に示したように野生型のニトリルヒドラターゼのサブユニットの160番目のArgがTrpに、サブユニットの186番目のLeuがArgにそれぞれ置換されていた。 40

【0462】

【表102】

表102

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 102	β-160番目 β-186番目	Arg Leu	Trp Arg	CGG CTG	TGG CGG

【実施例63】ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(103) クローンNo. 2のアミノ酸変異(サブユニットの6番目: LeuがThr)とクローンNo. 97のアミノ酸変異(サブユニットの36番目: ThrがMet; サブユニットの126番目: PheがTyr)を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認した。

10

【0463】

30mlの試験管に10mlのLB液体培地を調製し、121・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100μg/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、実施例58で得られたクローンNo. 97を一白金耳植菌し、37・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離(15000rpm×5分)により菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりプラスミドDNAを調製した。

20

【0464】

調製したプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 11記載のプライマー及びM13プライマーM4(配列表の配列番号: 8に配列を記載)を各々50pmol含む全量50μlの系(組成はキットに記載の条件による)で、熱変性(98)15秒、アニーリング(55)30秒、伸長反応(72)120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー(配列表の配列番号: 9に配列を記載)及びM13プライマーRV(配列表の配列番号: 10に配列を記載)を各々50pmol含む全量50μlの系(組成はキットに記載の条件による)で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1およびNo. 2の反応終了液各5μlを用いたアガロース電気泳動(アガロース濃度1.0重量%)によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 103を得た。

30

【0465】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0466】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表103に示したように野生型のニトリルヒドラターゼのサブユニットの6番目のLeuがThrに、サブユニットの36番目のThrがMetに、サブユニットの126番目のPheがTyrにそれぞれ置換されていた。

40

【0467】

【表103】

表103

クローン番号	変異箇所 (α サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 103	α -6番目	Leu	Thr	CTG	ACG
	α -36番目	Thr	Met	ACG	ATG
	α -126番目	Phe	Tyr	TTC	TAC

10

〔実施例64〕ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(104) クローンNo. 41のアミノ酸変異(サブユニットの71番目: ArgがHis)とクローンNo. 32のアミノ酸変異(サブユニットの19番目: AlaがVal; サブユニットの126番目: PheがTyr)を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

【0468】

30mlの試験管に10mlのLB液体培地を調製し、121・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100 μ g/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、参考例32で得られたクローンNo. 32を一白金耳植菌し、37・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離(15000rpm \times 5分)により菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりプラスミドDNAを調製した。

20

【0469】

調製したプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 42記載のプライマー及びM13プライマーM4(配列表の配列番号: 8に配列を記載)を各々50pmol含む全量50 μ lの系(組成はキットに記載の条件による)で、熱変性(98)15秒、アニーリング(55)30秒、伸長反応(72)120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー(配列表の配列番号: 9に配列を記載)及びM13プライマーRV(配列表の配列番号: 10に配列を記載)を各々50pmol含む全量50 μ lの系(組成はキットに記載の条件による)で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1およびNo. 2の反応終了液各5 μ lを用いたアガロース電気泳動(アガロース濃度1.0重量%)によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 104を得た。

30

【0470】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0471】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表104に示したように野生型のニトリルヒドラーゼのサブユニットの19番目のAlaがValに、サブユニットの71番目のArgがHisに、サブユニットの126番目のPheがTyrにそれぞれ置換されていた。

40

【0472】

【表104】

表104

クローン番号	変異箇所 (α サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 104	α -19番目	Ala	Val	GCG	GTG
	α -71番目	Arg	His	CGT	CAT
	α -126番目	Phe	Tyr	TTC	TAC

10

【実施例65】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(105) クローンNo. 40のアミノ酸変異(サブユニットの36番目: ThrがMet)とクローンNo. 98のアミノ酸変異(サブユニットの148番目: GlyがAsp; サブユニットの204番目: ValがArg)を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

【0473】

30mlの試験管に10mlのLB液体培地を調製し、121・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100 μ g/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、実施例59で得られたクローンNo. 98を一白金耳植菌し、37・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離(15000rpm \times 5分)により菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりプラスミドDNAを調製した。

20

【0474】

調製したプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 41記載のプライマー及びM13プライマーM4(配列表の配列番号: 8に配列を記載)を各々50pmol含む全量50 μ lの系(組成はキットに記載の条件による)で、熱変性(98)15秒、アニーリング(55)30秒、伸長反応(72)120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー(配列表の配列番号: 9に配列を記載)及びM13プライマーRV(配列表の配列番号: 10に配列を記載)を各々50pmol含む全量50 μ lの系(組成はキットに記載の条件による)で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1およびNo. 2の反応終了液各5 μ lを用いたアガロース電気泳動(アガロース濃度1.0重量%)によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 105を得た。

30

【0475】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0476】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表105に示したように野生型のニトリルヒドラーゼのサブユニットの36番目のThrがMetに、サブユニットの148番目のGlyがAspに、サブユニットの204番目のValがArgにそれぞれ置換されていた。

40

【0477】

【表105】

表105

クローン番号	変異箇所 (α サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 105	α -36番目	Thr	Met	ACG	ATG
	α -148番目	Gly	Asp	GGC	GAC
	α -204番目	Val	Arg	GTC	CGC

10

〔実施例66〕ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(106) クローンNo. 47のアミノ酸変異(サブユニットの10番目: ThrがAsp)とクローンNo. 101のアミノ酸変異(サブユニットの118番目: PheがVal; サブユニットの200番目: AlaがGlu)を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

【0478】

30mlの試験管に10mlのLB液体培地を調製し、121・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100 μ g/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、実施例61で得られたクローンNo. 101を一白金耳植菌し、37・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離(15000rpm \times 5分)により菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりプラスミドDNAを調製した。

20

【0479】

調製したプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 48記載のプライマー及びM13プライマーM4(配列表の配列番号: 8に配列を記載)を各々50pmol含む全量50 μ lの系(組成はキットに記載の条件による)で、熱変性(98)15秒、アニーリング(55)30秒、伸長反応(72)120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー(配列表の配列番号: 9に配列を記載)及びM13プライマーRV(配列表の配列番号: 10に配列を記載)を各々50pmol含む全量50 μ lの系(組成はキットに記載の条件による)で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1およびNo. 2の反応終了液各5 μ lを用いたアガロース電気泳動(アガロース濃度1.0重量%)によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 106を得た。

30

【0480】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0481】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表106に示したように野生型のニトリルヒドラーゼのサブユニットの10番目のThrがAspに、サブユニットの118番目のPheがValに、サブユニットの200番目のAlaがGluにそれぞれ置換されていた。

40

【0482】

【表106】

表106

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 106	β-10番目	Thr	Asp	ACC	GAC
	β-118番目	Phe	Val	TTC	GTC
	β-200番目	Ala	Glu	GCC	GAC

10

【実施例67】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(107) クローンNo. 56のアミノ酸変異(サブユニットの37番目:PheがLeu)とクローンNo. 100のアミノ酸変異(サブユニットの108番目:GluがAsp; サブユニットの200番目:AlaがGlu)を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

【0483】

30mlの試験管に10mlのLB液体培地を調製し、121・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100μg/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、参考例40で得られたクローンNo. 100を一白金耳植菌し、37・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離(15000rpm×5分)により菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりプラスミドDNAを調製した。

20

【0484】

調製したプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 57記載のプライマー及びM13プライマーM4(配列表の配列番号: 8に配列を記載)を各々50pmol含む全量50μlの系(組成はキットに記載の条件による)で、熱変性(98)15秒、アニーリング(55)30秒、伸長反応(72)120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー(配列表の配列番号: 9に配列を記載)及びM13プライマーRV(配列表の配列番号: 10に配列を記載)を各々50pmol含む全量50μlの系(組成はキットに記載の条件による)で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1およびNo. 2の反応終了液各5μlを用いたアガロース電気泳動(アガロース濃度1.0重量%)によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 107を得た。

30

【0485】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0486】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表107に示したように野生型のニトリルヒドラーゼのサブユニットの37番目のPheがLeuに、サブユニットの108番目のGluがAspに、サブユニットの200番目のAlaがGluにそれぞれ置換されていた。

40

【0487】

【表107】

表107

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 107	β-37番目	P h e	L e u	T T C	C T C
	β-108番目	G l u	A s p	G A G	G A T
	β-200番目	A l a	G l u	G C C	G A C

10

【実施例68】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(108) クローンNo. 58のアミノ酸変異(サブユニットの37番目:P h eがV a l)とクローンNo. 100のアミノ酸変異(サブユニットの108番目:G l uがA s p; サブユニットの200番目:A l aがG l u)を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

【0488】

30mlの試験管に10mlのLB液体培地を調製し、121・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100μg/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、参考例40で得られたクローンNo. 100を一白金耳植菌し、37・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離(15000rpm×5分)により菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりプラスミドDNAを調製した。

20

【0489】

調製したプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 59記載のプライマー及びM13プライマーM4(配列表の配列番号: 8に配列を記載)を各々50pmol含む全量50μlの系(組成はキットに記載の条件による)で、熱変性(98)15秒、アニーリング(55)30秒、伸長反応(72)120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー(配列表の配列番号: 9に配列を記載)及びM13プライマーRV(配列表の配列番号: 10に配列を記載)を各々50pmol含む全量50μlの系(組成はキットに記載の条件による)で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1およびNo. 2の反応終了液各5μlを用いたアガロース電気泳動(アガロース濃度1.0重量%)によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 108を得た。

30

【0490】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0491】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表108に示したように野生型のニトリルヒドラーゼのサブユニットの37番目のP h eがV a lに、サブユニットの108番目のG l uがA s pに、サブユニットの200番目のA l aがG l uにそれぞれ置換されていた。

40

【0492】

【表108】

表108

クローン番号	変異箇所 (β サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 108	β -37番目	P h e	V a l	T T C	G T C
	β -108番目	G l u	A s p	G A G	G A T
	β -200番目	A l a	G l u	G C C	G A C

10

【実施例69】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(109) クローンNo. 63のアミノ酸変異(サブユニットの41番目: P h eがI l e)とクローンNo. 99のアミノ酸変異(サブユニットの51番目: P h eがV a l; サブユニットの108番目: G l uがA s p)を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

【0493】

30mlの試験管に10mlのLB液体培地を調製し、121・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100 μ g/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、実施例60で得られたクローンNo. 99を一白金耳植菌し、37・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離(15000rpm \times 5分)により菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりプラスミドDNAを調製した。

20

【0494】

調製したプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 64記載のプライマー及びM13プライマーM4(配列表の配列番号: 8に配列を記載)を各々50pmol含む全量50 μ lの系(組成はキットに記載の条件による)で、熱変性(98)15秒、アニーリング(55)30秒、伸長反応(72)120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー(配列表の配列番号: 9に配列を記載)及びM13プライマーRV(配列表の配列番号: 10に配列を記載)を各々50pmol含む全量50 μ lの系(組成はキットに記載の条件による)で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1およびNo. 2の反応終了液各5 μ lを用いたアガロース電気泳動(アガロース濃度1.0重量%)によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 109を得た。

30

【0495】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0496】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表109に示したように野生型のニトリルヒドラーゼのサブユニットの41番目のP h eがI l eに、サブユニットの51番目のP h eがV a lに、サブユニットの108番目のG l uがA s pにそれぞれ置換されていた。

40

【0497】

【表109】

表109

クローン番号	変異箇所 (β サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 109	β -41番目	Phe	Ile	TTC	ATC
	β -51番目	Phe	Val	TTC	GTC
	β -108番目	Glu	Asp	GAG	GAT

10

[実施例 70] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (110)
クローン No. 68 のアミノ酸変異 (サブユニットの 46 番目 : Met が Lys) とク
クローン No. 37 のアミノ酸変異 (サブユニットの 108 番目 : Glu が Arg ; サ
サブユニットの 212 番目 : Ser が Tyr) を共に有しているアミノ酸置換体においても
ニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

【 0498 】

30 ml の試験管に 10 ml の LB 液体培地を調製し、121 ・ 20 分間のオートク
レーブにより滅菌した。この培地に終濃度が 100 μ g / ml となるようにアンピシリンを
添加した後、参考例 37 で得られたクローン No. 37 を一白金耳植菌し、37 ・ 30
0 rpm にて約 20 時間培養した。該培養液 1 ml を適当な遠心チューブに分取した後、
遠心分離 (15000 rpm \times 5 分) により菌体を分離した。続いてアルカリ SDS 抽出
法により該菌体よりプラスミド DNA を調製した。

20

【 0499 】

調製したプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR
反応 No. 1 は、配列表の配列番号 : 69 記載のプライマー及び M13 プライマー M4
(配列表の配列番号 : 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ l の系 (組成
はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98) 15 秒、アニーリング (55) 3
0 秒、伸長反応 (72) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR
反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号 : 9 に配列を記載) 及び M
13 プライマー RV (配列表の配列番号 : 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全
量 50 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操
作により行った。PCR 反応 No. 1 および No. 2 の反応終了液各 5 μ l を用いたアガ
ロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量 %) により DNA 増幅産物の分析を行ったと
ころ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質
転換体 No. 110 を得た。

30

【 0500 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は
100 % であった。

【 0501 】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI
社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法
によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 110 に
示したように野生型のニトリルヒドラーゼの サブユニットの 46 番目の Met が Lys
に、 サブユニットの 108 番目の Glu が Arg に、 サブユニットの 212 番目の
Ser が Tyr にそれぞれ置換されていた。

40

【 0502 】

【 表 110 】

表 1 1 0

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 110	β-46番目	Met	Lys	ATG	AAG
	β-108番目	Glu	Arg	GAG	CGG
	β-212番目	Ser	Tyr	TCC	TAC

10

【実施例 7 1】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (111) クローン No. 72 のアミノ酸変異 (サブユニットの 48 番目: Leu が Val) とクローン No. 37 のアミノ酸変異 (サブユニットの 108 番目: Glu が Arg; サブユニットの 212 番目: Ser が Tyr) を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

【0503】

30 ml の試験管に 10 ml の LB 液体培地を調製し、121・20 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が 100 μg/ml となるようにアンピシリンを添加した後、参考例 37 で得られたクローン No. 37 を一白金耳植菌し、37・300 rpm にて約 20 時間培養した。該培養液 1 ml を適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (15000 rpm × 5 分) により菌体を分離した。続いてアルカリ SDS 抽出法により該菌体よりプラスミド DNA を調製した。

20

【0504】

調製したプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 73 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μl の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98) 15 秒、アニーリング (55) 30 秒、伸長反応 (72) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μl の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 および No. 2 の反応終了液各 5 μl を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 111 を得た。

30

【0505】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0506】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 111 に示したように野生型のニトリルヒドラーゼのサブユニットの 48 番目の Leu が Val に、サブユニットの 108 番目の Glu が Arg に、サブユニットの 212 番目の Ser が Tyr にそれぞれ置換されていた。

40

【0507】

【表 111】

表 1 1 1

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 111	β-48番目	L e u	V a l	CTG	GTG
	β-108番目	G l u	A r g	GAG	CGG
	β-212番目	S e r	T y r	TCC	TAC

10

【実施例 7 2】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(112)
クローン No. 85 のアミノ酸変異(サブユニットの127番目: L e u が S e r)と
クローン No. 102 のアミノ酸変異(サブユニットの160番目: A r g が T r p
; サブユニットの186番目: L e u が A r g)を共に有しているアミノ酸置換体にお
いてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

【0508】

30ml の試験管に10ml のLB液体培地を調製し、121・20分間のオートク
レーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100μg/mlとなるようにアンピシリンを
添加した後、実施例62で得られたクローン No. 102を一白金耳植菌し、37・3
00rpmにて約20時間培養した。該培養液1mlを適当な遠心チューブに分取した後
、遠心分離(15000rpm×5分)により菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽
出法により該菌体よりプラスミドDNAを調製した。

20

【0509】

調製したプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR
反応 No. 1は、配列表の配列番号: 86記載のプライマー及びM13プライマーM4
(配列表の配列番号: 8に配列を記載)を各々50pmol含む全量50μlの系(組成
はキットに記載の条件による)で、熱変性(98)15秒、アニーリング(55)3
0秒、伸長反応(72)120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR
反応 No. 2は、MUT4プライマー(配列表の配列番号: 9に配列を記載)及びM
13プライマーRV(配列表の配列番号: 10に配列を記載)を各々50pmol含む全
量50μlの系(組成はキットに記載の条件による)で、PCR反応 No. 1と同様の操
作により行った。PCR反応 No. 1および No. 2の反応終了液各5μlを用いたアガ
ロース電気泳動(アガロース濃度1.0重量%)によりDNA増幅産物の分析を行ったと
ころ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質
転換体 No. 112を得た。

30

【0510】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は
100%であった。

【0511】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI
社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法
によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表112に
示したように野生型のニトリルヒドラーゼのサブユニットの127番目のL e u が S
e rに、サブユニットの160番目のA r g が T r pに、サブユニットの186番目
のL e u が A r gにそれぞれ置換されていた。

40

【0512】

【表 1 1 2】

表 112

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 112	β-127番目	Leu	Ser	CTG	TCG
	β-160番目	Arg	Trp	CGG	TGG
	β-186番目	Leu	Arg	CTG	CGG

10

【実施例 73】ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(113)
クローン No. 34 のアミノ酸変異とクローン No. 110 のアミノ酸変異を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認した。

【0513】

30 ml の試験管に 10 ml の LB 液体培地を調製し、121・20 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が 100 μg/ml となるようにアンピシリンを添加した後、参考例 34 で得られたクローン No. 34 および実施例 70 で得られたクローン No. 110 を一白金耳植菌し、37・300 rpm にて約 20 時間培養した。該培養液 1 ml を適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離(15000 rpm × 5 分)によりそれぞれの菌体を分離した。続いてアルカリ SDS 抽出法により該菌体よりクローン No. 34 及びクローン No. 110 のプラスミド DNA をそれぞれ調製した。

20

【0514】

クローン No. 110 のプラスミド DNA を EcoRI および NotI によって切断した後、アガロースゲル電気泳動(シグマ社製タイプ V II 低融点アガロース使用; アガロース濃度 1.0%)を行い、アガロースゲルから約 770 bp の DNA 断片を切り出した。同様に、クローン No. 34 のプラスミド DNA を EcoRI および NotI によって切断した後、アガロースゲル電気泳動(シグマ社製タイプ V II 低融点アガロース使用; アガロース濃度 0.7%)を行い、アガロースゲルから約 3.8 kbp の DNA 断片を切り出した。切り出した両アガロース片(約 0.1 g)を細かく粉碎し 1 ml の TE 溶液にそれぞれ懸濁後、55 で 1 時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って各 DNA 断片を精製し、最終的に 10 μl の TE に溶解した。

30

【0515】

この様にして得られたクローン No. 110 由来の約 770 bp の DNA 断片とクローン No. 34 由来の約 3.8 Kbp の DNA 断片を DNA ライゲーションキット(宝酒造社製)を用いて連結させてプラスミドを構築した。このプラスミドにより大腸菌 HB101 のコンピテントセル(東洋紡績社製)を形質転換し、形質転換体 No. 113 を得た。

【0516】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100%であった。

40

【0517】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 113 に示したように野生型のニトリルヒドラターゼの サブユニットの 6 番目の Leu が Thr に、 サブユニットの 19 番目の Ala が Val に、 サブユニットの 126 番目の Phe が Tyr に、 サブユニットの 46 番目の Met が Lys に、 サブユニットの 108 番目の Glu が Arg に、 サブユニットの 212 番目の Ser が Tyr にそれぞれ置換されていた。

50

【 0 5 1 8 】

【 表 1 1 3 】

表 1 1 3

クローン番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 113	α -6 番目	Leu	Thr	CTG	ACG
	α -19 番目	Ala	Val	GCG	GTG
	α -126 番目	Phe	Tyr	TTC	TAC
	β -46 番目	Met	Lys	ATG	AAG
	β -108 番目	Glu	Arg	GAG	CGG
	β -212 番目	Ser	Tyr	TCC	TAC

10

【 実施例 7 4 】 ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (1 1 4)
クローン No. 34 のアミノ酸変異とクローン No. 111 のアミノ酸変異を共に有して
いるアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認し
た。

20

【 0 5 1 9 】

30 ml の試験管に 10 ml の LB 液体培地を調製し、121 ・ 20 分間のオートクレ
ープにより滅菌した。この培地に終濃度が 100 μ g / ml となるようにアンピシリンを
添加した後、参考例 34 で得られたクローン No. 34 および実施例 7 1 で得られたクロ
ーン No. 111 を一白金耳植菌し、37 ・ 300 rpm にて約 20 時間培養した。該
培養液 1 ml を適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (15000 rpm \times 5 分)
によりそれぞれの菌体を分離した。続いてアルカリ SDS 抽出法により該菌体よりクロ
ーン No. 34 及びクローン No. 111 のプラスミド DNA をそれぞれ調製した。

30

【 0 5 2 0 】

クローン No. 111 のプラスミド DNA を EcoRI および NotI によって切断した後
、アガロースゲル電気泳動 (シグマ社製タイプ V II 低融点アガロース使用 ; アガロース
濃度 1.0 %) を行い、アガロースゲルから約 770 bp の DNA 断片を切り出した。同
様に、クローン No. 34 のプラスミド DNA を EcoRI および NotI によって切断し
た後、アガロースゲル電気泳動 (シグマ社製タイプ V II 低融点アガロース使用 ; アガロ
ース濃度 0.7 %) を行い、アガロースゲルから約 3.8 kbp の DNA 断片を切り出し
た。切り出した両アガロース片 (約 0.1 g) を細かく粉碎し 1 ml の TE 溶液にそれぞ
れ懸濁後、55 で 1 時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対して
フェノール / クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って各 DNA 断片を精製し、最終的
に 10 μ l の TE に溶解した。

40

【 0 5 2 1 】

この様にして得られたクローン No. 111 由来の約 770 bp の DNA 断片とクローン
No. 34 由来の約 3.8 Kbp の DNA 断片を DNA ライゲーションキット (宝酒造社
製) を用いて連結させてプラスミドを構築した。このプラスミドにより大腸菌 HB 101
のコンピテントセル (東洋紡績社製) を形質転換し、形質転換体 No. 114 を得た。

50

【 0 5 2 2 】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は
100 % であった。

【 0 5 2 3 】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI
社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法
によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 114 に

50

示したように野生型のニトリルヒドラターゼのサブユニットの6番目のLeuがThrに、サブユニットの19番目のAlaがValに、サブユニットの126番目のPheがTyrに、サブユニットの48番目のLeuがValに、サブユニットの108番目のGluがArgに、サブユニットの212番目のSerがTyrにそれぞれ置換されていた。

【0524】

【表114】

表114

クローン番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 114	α -6番目	Leu	Thr	CTG	ACG
	α -19番目	Ala	Val	GCG	GTG
	α -126番目	Phe	Tyr	TTC	TAC
	β -48番目	Leu	Val	CTG	GTG
	β -108番目	Glu	Arg	GAG	CGG
	β -212番目	Ser	Tyr	TCC	TAC

10

20

【実施例75】ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得
クローンNo. 35のアミノ酸変異とクローンNo. 112のアミノ酸変異を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認した。

【0525】

30mlの試験管に10mlのLB液体培地を調製し、121・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100 μ g/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、参考例35で得られたクローンNo. 35および実施例72で得られたクローンNo. 112を一白金耳植菌し、37・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離(15000rpm \times 5分)によりそれぞれの菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりクローンNo. 35及びクローンNo. 112のプラスミドDNAをそれぞれ調製した。

30

【0526】

クローンNo. 112のプラスミドDNAをEcoRIおよびNotIによって切断した後、アガロースゲル電気泳動(シグマ社製タイプVLI低融点アガロース使用;アガロース濃度1.0%)を行い、アガロースゲルから約770bpのDNA断片を切り出した。同様に、クローンNo. 35のプラスミドDNAをEcoRIおよびNotIによって切断した後、アガロースゲル電気泳動(シグマ社製タイプVLI低融点アガロース使用;アガロース濃度0.7%)を行い、アガロースゲルから約3.8kbpのDNA断片を切り出した。切りだした両アガロース片(約0.1g)を細かく粉碎し1mlのTE溶液にそれぞれ懸濁後、55で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って各DNA断片を精製し、最終的に10 μ lのTEに溶解した。

40

【0527】

この様にして得られたクローンNo. 112由来の約770bpのDNA断片とクローンNo. 35由来の約3.8KbpのDNA断片をDNAライゲーションキット(宝酒造社製)を用いて連結させてプラスミドを構築した。このプラスミドにより大腸菌HB101のコンピテントセル(東洋紡績社製)を形質転換し、形質転換体No. 115を得た。

【0528】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は

50

100%であった。

【0529】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表115に示したように野生型のニトリルヒドラターゼのサブユニットの6番目のLeuがAlaに、サブユニットの19番目のAlaがValに、サブユニットの126番目のPheがTyrに、サブユニットの127番目のLeuがSerに、サブユニットの160番目のArgがTrpに、サブユニットの186番目のLeuがArgにそれぞれ置換されていた。

10

【0530】

【表115】

表115

クローン番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 115	α -6番目	Leu	Ala	CTG	GCG
	α -19番目	Ala	Val	GCG	GTG
	α -126番目	Phe	Tyr	TTC	TAC
	β -127番目	Leu	Ser	CTG	TCG
	β -160番目	Arg	Trp	CGG	TGG
	β -186番目	Leu	Arg	CTG	CGG

20

【実施例76】ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(118)

クローンNo. 103のアミノ酸変異とクローンNo. 106のアミノ酸変異を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認した。

【0531】

30

30mlの試験管に10mlのLB液体培地を調製し、121・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100 μ g/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、実施例63で得られたクローンNo. 103および実施例66で得られたクローンNo. 106を一白金耳植菌し、37・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離(15000rpm \times 5分)によりそれぞれの菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりクローンNo. 103及びクローンNo. 106のプラスミドDNAをそれぞれ調製した。

【0532】

クローンNo. 106のプラスミドDNAをEcoRIおよびNotIによって切断した後、アガロースゲル電気泳動(シグマ社製タイプVLI低融点アガロース使用;アガロース濃度1.0%)を行い、アガロースゲルから約770bpのDNA断片を切り出した。同様に、クローンNo. 103のプラスミドDNAをEcoRIおよびNotIによって切断した後、アガロースゲル電気泳動(シグマ社製タイプVLI低融点アガロース使用;アガロース濃度0.7%)を行い、アガロースゲルから約3.8kbpのDNA断片を切り出した。切り出した両アガロース片(約0.1g)を細かく粉碎し1mlのTE溶液にそれぞれ懸濁後、55で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って各DNA断片を精製し、最終的に10 μ lのTEに溶解した。

40

【0533】

この様にして得られたクローンNo. 106由来の約770bpのDNA断片とクローン

50

No. 103 由来の約 3.8 Kbp の DNA 断片を DNA ライゲーションキット（宝酒造社製）を用いて連結させてプラスミドを構築した。このプラスミドにより大腸菌 HB101 のコンピテントセル（東洋紡績社製）を形質転換し、形質転換体 No. 116 を得た。

【0534】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0535】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 116 に示したように野生型のニトリルヒドラーゼのサブユニットの 6 番目の Leu が Thr に、サブユニットの 36 番目の Thr が Met に、サブユニットの 126 番目の Phe が Tyr に、サブユニットの 10 番目の Thr が Asp に、サブユニットの 118 番目の Phe が Val に、サブユニットの 200 番目の Ala が Glu にそれぞれ置換されていた。

10

【0536】

【表 116】

表 116

クローン番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 116	α -6 番目	Leu	Thr	CTG	ACG
	α -36 番目	Thr	Met	ACG	ATG
	α -126 番目	Phe	Tyr	TTC	TAC
	β -10 番目	Thr	Asp	ACC	GAC
	β -118 番目	Phe	Val	TTC	GTC
	β -200 番目	Ala	Glu	GCC	GAC

20

30

〔実施例 77〕ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（119）
クローン No. 104 のアミノ酸変異とクローン No. 107 のアミノ酸変異を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

【0537】

30 ml の試験管に 10 ml の LB 液体培地を調製し、121・20 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が 100 μ g/ml となるようにアンピシリンを添加した後、実施例 64 で得られたクローン No. 104 および実施例 67 で得られたクローン No. 107 を一白金耳植菌し、37・300 rpm にて約 20 時間培養した。該培養液 1 ml を適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離（15000 rpm \times 5 分）によりそれぞれの菌体を分離した。続いてアルカリ SDS 抽出法により該菌体よりクローン No. 104 及びクローン No. 107 のプラスミド DNA をそれぞれ調製した。

40

【0538】

クローン No. 107 のプラスミド DNA を EcoRI および NotI によって切断した後、アガロースゲル電気泳動（シグマ社製タイプ V II 低融点アガロース使用；アガロース濃度 1.0%）を行い、アガロースゲルから約 770 bp の DNA 断片を切り出した。同様に、クローン No. 104 のプラスミド DNA を EcoRI および NotI によって切断した後、アガロースゲル電気泳動（シグマ社製タイプ V II 低融点アガロース使用；アガロース濃度 0.7%）を行い、アガロースゲルから約 3.8 kbp の DNA 断片を切り出した。切り出した両アガロース片（約 0.1 g）を細かく粉碎し 1 ml の TE 溶液にそれ

50

ぞれ懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って各DNA断片を精製し、最終的に100μlのTEに溶解した。

【0539】

この様にして得られたクローンNo. 107由来の約770bpのDNA断片とクローンNo. 104由来の約3.8KbpのDNA断片をDNAライゲーションキット（宝酒造社製）を用いて連結させてプラスミドを構築した。このプラスミドにより大腸菌HB101のコンピテントセル（東洋紡績社製）を形質転換し、形質転換体No. 117を得た。

【0540】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。 10

【0541】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表117に示したように野生型のニトリルヒドラーゼのサブユニットの19番目のAlaがValに、サブユニットの71番目のArgがHisに、サブユニットの126番目のPheがTyrに、サブユニットの37番目のPheがLeuに、サブユニットの108番目のGluがAspに、サブユニットの200番目のAlaがGluにそれぞれ置換されていた。 20

【0542】

【表117】

表117

クローン番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 117	α-19番目	Ala	Val	GCG	GTG
	α-71番目	Arg	His	CGT	CAT
	α-126番目	Phe	Tyr	TTC	TAC
	β-37番目	Phe	Leu	TTC	CTC
	β-108番目	Glu	Asp	GAG	GAT
	β-200番目	Ala	Glu	GCC	GAC

30

[実施例78] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(120) クローンNo. 104のアミノ酸変異とクローンNo. 108のアミノ酸変異を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

【0543】

30mlの試験管に10mlのLB液体培地を調製し、121℃・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100μg/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、実施例64で得られたクローンNo. 104および実施例68で得られたクローンNo. 108を一白金耳植菌し、37℃・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離(15000rpm×5分)によりそれぞれの菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりクローンNo. 104及びクローンNo. 108のプラスミドDNAをそれぞれ調製した。

40

【0544】

クローンNo. 108のプラスミドDNAをEcoRIおよびNotIによって切断した後、アガロースゲル電気泳動(シグマ社製タイプVIEI低融点アガロース使用; アガロース 50

濃度 1.0%) を行い、アガロースゲルから約 770 bp の DNA 断片を切り出した。同様に、クローン No. 104 のプラスミド DNA を EcoRI および NotI によって切断した後、アガロースゲル電気泳動 (シグマ社製タイプ V II 低融点アガロース使用; アガロース濃度 0.7%) を行い、アガロースゲルから約 3.8 kbp の DNA 断片を切り出した。切り出した両アガロース片 (約 0.1 g) を細かく粉碎し 1 ml の TE 溶液にそれぞれ懸濁後、55℃ で 1 時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って各 DNA 断片を精製し、最終的に 10 μl の TE に溶解した。

【0545】

この様にして得られたクローン No. 108 由来の約 770 bp の DNA 断片とクローン No. 104 由来の約 3.8 Kbp の DNA 断片を DNA ライゲーションキット (宝酒造社製) を用いて連結させてプラスミドを構築した。このプラスミドにより大腸菌 HB101 のコンピテントセル (東洋紡績社製) を形質転換し、形質転換体 No. 118 を得た。

【0546】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0547】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 118 に示したように野生型のニトリルヒドラーゼのサブユニットの 19 番目の Ala が Val に、サブユニットの 71 番目の Arg が His に、サブユニットの 126 番目の Phe が Tyr に、サブユニットの 37 番目の Phe が Val に、サブユニットの 108 番目の Glu が Asp に、サブユニットの 200 番目の Ala が Glu にそれぞれ置換されていた。

【0548】

【表 118】

表 118

クローン番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 118	α-19 番目	Ala	Val	GCG	GTG
	α-71 番目	Arg	His	CGT	CAT
	α-126 番目	Phe	Tyr	TTC	TAC
	β-37 番目	Phe	Val	TTC	GTC
	β-108 番目	Glu	Asp	GAG	GAT
	β-200 番目	Ala	Glu	GCC	GAC

[実施例 79] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (119) クローン No. 105 のアミノ酸変異とクローン No. 109 のアミノ酸変異を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

【0549】

30 ml の試験管に 10 ml の LB 液体培地を調製し、121℃・20 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が 100 μg/ml となるようにアンピシリンを添加した後、実施例 65 で得られたクローン No. 105 および実施例 69 で得られたクローン No. 109 を一白金耳植菌し、37℃・300 rpm にて約 20 時間培養した。該培養液 1 ml を適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (15000 rpm × 5 分

）によりそれぞれの菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりクローンNo. 105及びクローンNo. 109のプラスミドDNAをそれぞれ調製した。

【0550】

クローンNo. 109のプラスミドDNAをEcoRIおよびNotIによって切断した後、アガロースゲル電気泳動（シグマ社製タイプVLI低融点アガロース使用；アガロース濃度1.0%）を行い、アガロースゲルから約770bpのDNA断片を切り出した。同様に、クローンNo. 105のプラスミドDNAをEcoRIおよびNotIによって切断した後、アガロースゲル電気泳動（シグマ社製タイプVLI低融点アガロース使用；アガロース濃度0.7%）を行い、アガロースゲルから約3.8kbpのDNA断片を切り出した。切り出した両アガロース片（約0.1g）を細かく粉碎し1mlのTE溶液にそれぞれ懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って各DNA断片を精製し、最終的に10μlのTEに溶解した。

10

【0551】

この様にして得られたクローンNo. 109由来の約770bpのDNA断片とクローンNo. 105由来の約3.8KbpのDNA断片をDNAライゲーションキット（宝酒造社製）を用いて連結させてプラスミドを構築した。このプラスミドにより大腸菌HB101のコンピテントセル（東洋紡績社製）を形質転換し、形質転換体No. 119を得た。

【0552】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

20

【0553】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表119に示したように野生型のニトリルヒドラターゼのサブユニットの36番目のThrがMetに、サブユニットの148番目のGlyがAspに、サブユニットの204番目のValがArgに、サブユニットの41番目のPheがIleに、サブユニットの51番目のPheがValに、サブユニットの108番目のGluがAspにそれぞれ置換されていた。

30

【0554】

【表119】

表119

クローン番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 119	α-36番目	Thr	Met	ACG	ATG
	α-148番目	Gly	Asp	GGC	GAC
	α-204番目	Val	Arg	GTC	CGC
	β-41番目	Phe	Ile	TTC	ATC
	β-51番目	Phe	Val	TTC	GTC
	β-108番目	Glu	Asp	GAG	GAT

40

〔実施例80〕ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（120）
クローンNo. 98のアミノ酸変異とクローンNo. 100のアミノ酸変異を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認した。

【0555】

50

30 ml の試験管に 10 ml の LB 液体培地を調製し、121・20 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるようにアンピシリンを添加した後、実施例 59 で得られたクローン No. 98 および参考例 40 で得られたクローン No. 100 を一白金耳植菌し、37・300 rpm にて約 20 時間培養した。該培養液 1 ml を適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (15000 rpm \times 5 分) によりそれぞれの菌体を分離した。続いてアルカリ SDS 抽出法により該菌体よりクローン No. 98 及びクローン No. 100 のプラスミド DNA をそれぞれ調製した。

【0556】

クローン No. 100 のプラスミド DNA を EcoRI および NotI によって切断した後、アガロースゲル電気泳動 (シグマ社製タイプ V II 低融点アガロース使用; アガロース濃度 1.0%) を行い、アガロースゲルから約 770 bp の DNA 断片を切り出した。同様に、クローン No. 98 のプラスミド DNA を EcoRI および NotI によって切断した後、アガロースゲル電気泳動 (シグマ社製タイプ V II 低融点アガロース使用; アガロース濃度 0.7%) を行い、アガロースゲルから約 3.8 kbp の DNA 断片を切り出した。切り出した両アガロース片 (約 0.1 g) を細かく粉碎し 1 ml の TE 溶液にそれぞれ懸濁後、55 で 1 時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って各 DNA 断片を精製し、最終的に 10 μl の TE に溶解した。

【0557】

この様にして得られたクローン No. 100 由来の約 770 bp の DNA 断片とクローン No. 98 由来の約 3.8 Kbp の DNA 断片を DNA ライゲーションキット (宝酒造社製) を用いて連結させてプラスミドを構築した。このプラスミドにより大腸菌 HB101 のコンピテントセル (東洋紡績社製) を形質転換し、形質転換体 No. 120 を得た。

【0558】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0559】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 120 に示したように野生型のニトリルヒドラーゼのサブユニットの 148 番目の Gly が Asp に、サブユニットの 204 番目の Val が Arg に、サブユニットの 108 番目の Glu が Asp に、サブユニットの 200 番目の Ala が Glu にそれぞれ置換されていた。

【0560】

【表 120】

表 120

クローン番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 120	α -148 番目	Gly	Asp	GGC	GAC
	α -204 番目	Val	Arg	GTC	CGC
	β -108 番目	Glu	Asp	GAG	GAT
	β -200 番目	Ala	Glu	GCC	GAC

【0561】

【発明の効果】

本発明により、シュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラーゼの本質

的な機能を変化させる事の無い新規な変異点を有するニトリルヒドラーゼのアミノ酸配列及び該遺伝子の塩基配列が提供される。さらに、該遺伝子を含むプラスミド、該プラスミドを含む形質転換体、該形質転換体を用いた該酵素の産生方法、及び該形質転換体を用いたニトリル化合物からの対応するアミド化合物の製造方法が提供される。

【 0 5 6 2 】

【 配 列 表 】

SEQUENCE LISTING

<110> MITSUI CHEMICALS, INC.

<120> Nitrile hydratase

10

<130>

<160> 97

<210> 1

<211> 205

<212> PRT

<213> *Pseudonocardia thermophila*

<220>

20

<221> source

<222> 1..205

<223> /organism="Pseudonocardia thermophila"

/strain="JCM3095"

<220>

<221> CDS

<222> 1..205

30

<223> /gene="nitrile hydratase alpha subunit"

/product="nitrile hydratase alpha subunit"

<400> 1

Met Thr Glu Asn Ile Leu Arg Lys Ser Asp Glu Glu Ile Gln Lys Glu

5

10

15

Ile Thr Ala Arg Val Lys Ala Leu Glu Ser Met Leu Ile Glu Gln Gly

20

25

30

40

Ile Leu Thr Thr Ser Met Ile Asp Arg Met Ala Glu Ile Tyr Glu Asn

35

40

45

Glu Val Gly Pro His Leu Gly Ala Lys Val Val Val Lys Ala Trp Thr

50

55

60

Asp Pro Glu Phe Lys Lys Arg Leu Leu Ala Asp Gly Thr Glu Ala Cys

65	70	75	80
Lys Glu Leu Gly Ile Gly Gly Leu Gln Gly Glu Asp Met Met Trp Val			
	85	90	95
Glu Asn Thr Asp Glu Val His His Val Val Val Cys Thr Leu Cys Ser			
	100	105	110
Cys Tyr Pro Trp Pro Val Leu Gly Leu Pro Pro Asn Trp Phe Lys Glu			
	115	120	125
Pro Gln Tyr Arg Ser Arg Val Val Arg Glu Pro Arg Gln Leu Leu Lys			
	130	135	140
Glu Glu Phe Gly Phe Glu Val Pro Pro Ser Lys Glu Ile Lys Val Trp			
145	150	155	160
Asp Ser Ser Ser Glu Met Arg Phe Val Val Leu Pro Gln Arg Pro Ala			
	165	170	175
Gly Thr Asp Gly Trp Ser Glu Glu Glu Leu Ala Thr Leu Val Thr Arg			
	180	185	190
Glu Ser Met Ile Gly Val Glu Pro Ala Lys Ala Val Ala			
	195	200	205

10

20

30

40

<210> 2

<211> 223

<212> PRT

<213> Pseudonocardia thermophila

<220>

<221> source

<222> 1..223

<223> /organism="Pseudonocardia thermophila"

/strain="JCM3095"

<220>

<221> CDS

<222> 1..223

<223> /gene="nitrile hydratase beta subunit"

/product="nitrile hydratase beta subunit"

<400> 2

Met Asn Gly Val Tyr Asp Val Gly Gly Thr Asp Gly Leu Gly Pro Ile

5

10

15

Asn Arg Pro Ala Asp Glu Pro Val Phe Arg Ala Glu Trp Glu Lys Val

20

25

30

Ala Phe Ala Met Phe Pro Ala Thr Phe Arg Ala Gly Phe Met Gly Leu

35

40

45

Asp Glu Phe Arg Phe Gly Ile Glu Gln Met Asn Pro Ala Glu Tyr Leu

50

55

60

Glu Ser Pro Tyr Tyr Trp His Trp Ile Arg Thr Tyr Ile His His Gly

65

70

75

80

Val Arg Thr Gly Lys Ile Asp Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Thr Gln

85

90

95

Tyr Tyr Arg Glu Asn Pro Asp Ala Pro Leu Pro Glu His Glu Gln Lys

100

105

110

Pro Glu Leu Ile Glu Phe Val Asn Gln Ala Val Tyr Gly Gly Leu Pro

115

120

125

Ala Ser Arg Glu Val Asp Arg Pro Pro Lys Phe Lys Glu Gly Asp Val

130

135

140

Val Arg Phe Ser Thr Ala Ser Pro Lys Gly His Ala Arg Arg Ala Arg

145

150

155

160

Tyr Val Arg Gly Lys Thr Gly Thr Val Val Lys His His Gly Ala Tyr

165

170

175

Ile Tyr Pro Asp Thr Ala Gly Asn Gly Leu Gly Glu Cys Pro Glu His

180

185

190

Leu Tyr Thr Val Arg Phe Thr Ala Gln Glu Leu Trp Gly Pro Glu Gly

195

200

205

10

20

30

40

Asp Pro Asn Ser Ser Val Tyr Tyr Asp Cys Trp Glu Pro Tyr Ile Glu

210

215

220

Leu Val Asp Thr Lys Ala Ala Ala Ala

225

230

233

<210> 3

<211> 618

<212> DNA

<213> *Pseudonocardia thermophila*

<220>

<221> source

<222> 1..618

<223> /organism="Pseudonocardia thermophila"

/strain="JCM3095"

<220>

<221> CDS

<222> 1..618

<223> /gene="nitrile hydratase alpha subunit"

/product="nitrile hydratase alpha subunit"

<400> 3

atgaccgaga acatcctgcg caagtcggac gaggagatcc agaaggagat cacggcgcgg 60

gtcaaggccc tggagtcgat gtcacgcga cagggcaccc tcaccacgtc gatgatcgac 120

cggatggccc agatctacga gaacgaggtc ggcccgcacc tcggcgcgaa ggtcgtcgtg 180

aaggccctgga ccgacccgga gtccaagaag cgctcgtcgc ccgacggcac cgaggccctgc 240

aaggagctcg gcacggcggg cctgcagggc gaggacatga tgtgggtgga gaacaccgac 300

gaggctccacc acgtcgtcgt gtgcacgctc tgcctcgtct acccgtggcc ggtgctgggg 360

ctgccgccga actgggttcaa ggagccgcag taccgctccc gcgtgggtgcg tgagccccgg 420

cagctgtca aggaggagtt cggcttcgag gtcccgccga gcaaggagat caaggctcgg 480

gactccagct ccgagatgcg ctctcgtcgc ctcccgcagc gccccgcggg caccgacggg 540

tggagcgagg aggagctcgc caccctcgtc acccgcgagt cgatgatcgg cgtcgaaccg 600

10

20

30

40

gcgaaggcgg tcgctga

618

<210> 4

<211> 702

<212> DNA

<213> *Pseudonocardia thermophila*

<220>

<221> source

<222> 1..702

<223> /organism="Pseudonocardia thermophila"

/strain="JCM3095"

<220>

<221> CDS

<222> 1..702

<223> /gene="nitrile hydratase beta subunit"

/product="nitrile hydratase beta subunit"

<400> 4

atgaacggcg tgtacgacgt cggcggcacc gatgggctgg gcccgatcaa ccggcccgcg 60
 gacgaaccgg tcttcgcgc cgagtgggag aaggtcgcgt tcgcatgtt cccggcgacg 120
 ttccgggccg gcttcattggg cctggacgag ttccggttcg gcatcgagca gatgaaccgg 180
 gccgagtacc tcgagtcgcc gtactactgg cactggatcc gcacctacat ccaccacggc 240
 gtccgcaccg gcaagatcga tctcgaggag ctggagcgcc gcacgcagta ctaccgggag 300
 aaccccgacg ccccgctgcc cgagcacgag cagaagccgg agttgatcga gttcgtcaac 360
 caggccgtct acggcgggct gcccgcaagc cgggaggctg accgaccgcc caagttcaag 420
 gaggcgacg tggtcgggtt ctccaccgcg agcccgaagg gccacgcccg gcgcgcgcgg 480
 tacgtgcgcg gcaagaccgg gacggtggtc aagcaccacg gcgcgtacat ctaccgggac 540
 accgcccggca acggcctggg cgagtgcgcc gagcacctct acaccgtccg cttcacggcc 600
 caggagctgt gggggccgga aggggacccg aactccagcg tctactacga ctgctgggag 660
 ccctacatcg agctcgtcga cacgaaggcg gccgcggcat ga 702

<210> 5

10

20

30

40

<211> 144
 <212> PRT
 <213> *Pseudonocardia thermophila*
 <220>
 <221> source
 <222> 1..144
 <223> /organism="Pseudonocardia thermophila"
 /strain="JCM3095" 10
 <220>
 <221> CDS
 <222> 1..144
 <223> /gene="gene encoding protein participation in the activation of ni
 trile hydratase"
 /product="protein participation in the activation of nitrile hydra 20
 tase"
 <220>
 <221> INT#MET
 <222> 1
 <400> 5
 Met Ser Ala Glu Ala Lys Val Arg Leu Lys His Cys Pro Thr Ala Glu
 1 5 10 15 30
 Asp Arg Ala Ala Ala Asp Ala Leu Leu Ala Gln Leu Pro Gly Gly Asp
 20 25 30
 Arg Ala Leu Asp Arg Gly Phe Asp Glu Pro Trp Gln Leu Arg Ala Phe
 35 40 45
 Ala Leu Ala Val Ala Ala Cys Arg Ala Gly Arg Phe Glu Trp Lys Gln
 50 55 60
 Leu Gln Gln Ala Leu Ile Ser Ser Ile Gly Glu Trp Glu Arg Thr His 40
 65 70 75 80

Asp Leu Asp Asp Pro Ser Trp Ser Tyr Tyr Glu His Phe Val Ala Ala
 85 90 95
 Leu Glu Ser Val Leu Gly Glu Glu Gly Ile Val Glu Pro Glu Ala Leu
 100 105 110
 Asp Glu Arg Thr Ala Glu Val Leu Ala Asn Pro Pro Asn Lys Asp His
 115 120 125
 His Gly Pro His Leu Glu Pro Val Ala Val His Pro Ala Val Arg Ser
 130 135 140

10

<210> 6

<211> 435

<212> DNA

<213> *Pseudonocardia thermophila*

<220>

20

<221> source

<222> 1..435

<223> /organism="Pseudonocardia thermophila"
 /strain="JCM3095"

<220>

<221> CDS

<222> 1..435

30

<223> /gene="gene encoding protein participation in the activation of ni
 trile hydratase"

 /product="protein participation in the activation of nitrile hydra
 tase"

<220>

<221> int#codon

<222> 1..3

40

<400> 6

gtgagcgccg aggcgaaggt ccgcctgaag cactgcccc aaggccgagga ccggcgccgc 60
 gccgacgcgc tgctcgcgca gctgcccggc ggcgaccgcg cgctcgaccg cggttcgac 120
 gagccgtggc agctcgggc gttcgcgctg gcggtcgcg cgctcagggc gggccggttc 180
 gagtggaaagc agctcgagca ggcgctgac tcctcgatcg gggagtggga gcgcacccac 240
 gatctcgacg atccgagctg gtccctactac gagcattcg tcgccgcgct ggaatccgtg 300
 ctccggcgagg aaggatcgt cgagccggag gcgctggacg agcgcaccgc ggaggtcttg 360
 gccaaaccgc cgaacaagga tcaccaatgga ccgcattcgg agcccgtcgc ggtccaccgc 420
 gccgtgcggt cctga 435

10

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

20

<400> 7

aacatcatgc gcaagtcg 18

<210> 8

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

30

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 8

caggaaacag ctatgac 17

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 9

ggccagtgcc tagcttacat

20

<210> 10

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 10

gttttcccag tcacgac

17

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 11

aacatcacgc gcaagtcg

18

<210> 12

<211> 18

30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 12

aacatcgcg gcaagtcg

18

<210> 13

40

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 13

aacatcgtgc gcaagtcg

18

<210> 14

10

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 14

atcacgggtgc gggtaag

18

20

<210> 15

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 15

30

acgtcgttga tcgaccgg

18

<210> 16

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

40

<400> 16

gacggctccg aggcctgc	18	
⟨210⟩ 17		
⟨211⟩ 18		
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ Artificial Sequence		
⟨220⟩		
⟨223⟩ Oligonucleotide to act as a PCR primer		10
⟨400⟩ 17		
ctgcaggccg aggacatg	18	
⟨210⟩ 18		
⟨211⟩ 18		
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ Artificial Sequence		
⟨220⟩		20
⟨223⟩ Oligonucleotide to act as a PCR primer		
⟨400⟩ 18		
gacgaggccc accacgtc	18	
⟨210⟩ 19		
⟨211⟩ 18		
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ Artificial Sequence		30
⟨220⟩		
⟨223⟩ Oligonucleotide to act as a PCR primer		
⟨400⟩ 19		
cacgtcatcg tgtgcacg	18	
⟨210⟩ 20		
⟨211⟩ 18		
⟨212⟩ DNA		40
⟨213⟩ Artificial Sequence		

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 20

aactggtaca aggagccg

18

<210> 21

<211> 18

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 21

gagccggagt accgctcc

18

<210> 22

<211> 18

20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 22

cggcaggtgc tcaaggag

18

<210> 23

30

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 23

aaggaggact tcggcttc

18

40

<210> 24

<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer
<400> 24
gagctcacca ccctcgtc 18 10
<210> 25
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer
<400> 25 20
cgcgagtga tgatcggc 18
<210> 26
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer 30
<400> 26
gcgaaggagg tcgcgtga 18
<210> 27
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220> 40
<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

⟨400⟩ 27		
cggcccgtgg acgaaccg	18	
⟨210⟩ 28		
⟨211⟩ 18		
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ Artificial Sequence		
⟨220⟩		10
⟨223⟩ Oligonucleotide to act as a PCR primer		
⟨400⟩ 28		
cccgccgaacg aaccggtc	18	
⟨210⟩ 29		
⟨211⟩ 18		
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ Artificial Sequence		20
⟨220⟩		
⟨223⟩ Oligonucleotide to act as a PCR primer		
⟨400⟩ 29		
ctgcccgate acgagcag	18	
⟨210⟩ 30		
⟨211⟩ 18		
⟨212⟩ DNA		30
⟨213⟩ Artificial Sequence		
⟨220⟩		
⟨223⟩ Oligonucleotide to act as a PCR primer		
⟨400⟩ 30		
ctgcccccgac acgagcag	18	
⟨210⟩ 31		
⟨211⟩ 18		40
⟨212⟩ DNA		

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 31

ctgccctcgc acgagcag 18

<210> 32

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 32

ctgccccggc acgagcag 18

<210> 33

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 33

ctgccctgcc acgagcag 18

<210> 34

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 34

ctgccccctgc acgagcag 18

10

20

30

40

<210> 35		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer		
<400> 35		10
ctgcccacgc acgagcag	18	
<210> 36		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer		20
<400> 36		
ttcacggacc aggagctg	18	
<210> 37		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		30
<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer		
<400> 37		
ttcacgatcc aggagctg	18	
<210> 38		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		40
<220>		

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 38

ttcacggtcc aggagctg

18

<210> 39

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 39

ttcacggagc aggagctg

18

<210> 40

<211> 18

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 40

ccgaactaca gcgtctac

18

<210> 41

<211> 18

30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 41

ctcaccatgt cgatgac

18

<210> 42

40

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 42

aagaagcatc tgctcgcc

18

<210> 43

10

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 43

gagttcgact tcgaggtc

18

20

<210> 44

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 44

30

aaggcgcgcg cgtgagcg

18

<210> 45

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

40

<400> 45

aaggcgaaaag cgtgagcg	18	
⟨210⟩ 46		
⟨211⟩ 18		
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ Artificial Sequence		
⟨220⟩		
⟨223⟩ Oligonucleotide to act as a PCR primer		10
⟨400⟩ 46		
aaggcgtggg cgtgagcg	18	
⟨210⟩ 47		
⟨211⟩ 18		
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ Artificial Sequence		
⟨220⟩		20
⟨223⟩ Oligonucleotide to act as a PCR primer		
⟨400⟩ 47		
aaggcgaccg cgtgagcg	18	
⟨210⟩ 48		
⟨211⟩ 18		
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ Artificial Sequence		30
⟨220⟩		
⟨223⟩ Oligonucleotide to act as a PCR primer		
⟨400⟩ 48		
ggcggcgacg atgggctg	18	
⟨210⟩ 49		
⟨211⟩ 18		
⟨212⟩ DNA		40
⟨213⟩ Artificial Sequence		

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 49

ggcggcgaag atgggctg

18

<210> 50

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 50

ggcggctggg atgggctg

18

<210> 51

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 51

ggcggcggcg atgggctg

18

<210> 52

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 52

ggcggctacg atgggctg

18

<210> 53

10

20

30

40

⟨211⟩ 18		
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ Artificial Sequence		
⟨220⟩		
⟨223⟩ Oligonucleotide to act as a PCR primer		
⟨400⟩ 53		
ggcggctgcg atgggctg	18	10
⟨210⟩ 54		
⟨211⟩ 18		
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ Artificial Sequence		
⟨220⟩		
⟨223⟩ Oligonucleotide to act as a PCR primer		
⟨400⟩ 54		20
gagaaggcg cggtcgcg	18	
⟨210⟩ 55		
⟨211⟩ 18		
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ Artificial Sequence		
⟨220⟩		
⟨223⟩ Oligonucleotide to act as a PCR primer		30
⟨400⟩ 55		
gcgatgaccc cggcgacg	18	
⟨210⟩ 56		
⟨211⟩ 18		
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ Artificial Sequence		
⟨220⟩		40
⟨223⟩ Oligonucleotide to act as a PCR primer		

⟨400⟩ 56		
gcgatggccc cggcgacg	18	
⟨210⟩ 57		
⟨211⟩ 18		
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ Artificial Sequence		
⟨220⟩		10
⟨223⟩ Oligonucleotide to act as a PCR primer		
⟨400⟩ 57		
gcgatgctcc cggcgacg	18	
⟨210⟩ 58		
⟨211⟩ 18		
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ Artificial Sequence		20
⟨220⟩		
⟨223⟩ Oligonucleotide to act as a PCR primer		
⟨400⟩ 58		
gcgatgatcc cggcgacg	18	
⟨210⟩ 59		
⟨211⟩ 18		
⟨212⟩ DNA		30
⟨213⟩ Artificial Sequence		
⟨220⟩		
⟨223⟩ Oligonucleotide to act as a PCR primer		
⟨400⟩ 59		
gcgatggtcc cggcgacg	18	
⟨210⟩ 60		
⟨211⟩ 18		40
⟨212⟩ DNA		

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 60

gcgacggaac gggccggc

18

<210> 61

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 61

gcgacgaccc gggccggc

18

<210> 62

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 62

gcgacggccc gggccggc

18

<210> 63

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 63

gcgacgctcc gggccggc

18

10

20

30

40

<210> 64

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 64

gcgacgatcc gggccggc

18

<210> 65

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 65

gcgacggatcc gggccggc

18

<210> 66

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 66

ggcttcgggg gcctggac

18

<210> 67

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

20

30

40

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 67

ggcttctatg gcctggac

18

<210> 68

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 68

ggcttccctgg gcctggac

18

<210> 69

<211> 18

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 69

ggcttcaagg gcctggac

18

<210> 70

<211> 18

30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 70

ggcttcgatg gcctggac

18

<210> 71

40

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 71

atgggcggg acgagttc 18

<210> 72

10

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 72

atgggcggg acgagttc 18

20

<210> 73

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 73

30

atggcgtag acgagttc 18

<210> 74

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

40

<400> 74

atgggctcgg acgagttc	18	
<210> 75		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer		10
<400> 75		
atgggcacgg acgagttc	18	
<210> 76		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		20
<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer		
<400> 76		
atgggccggg acgagttc	18	
<210> 77		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		30
<220>		
<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer		
<400> 77		
gacgaggccc ggttcggc	18	
<210> 78		
<211> 18		
<212> DNA		40
<213> Artificial Sequence		

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 78

gacgagtcgc gggtcggc

18

<210> 79

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 79

tggcacttta tccgcacc

18

<210> 80

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 80

atcgaggccg tcaaccag

18

<210> 81

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 81

atcgagctcg tcaaccag

18

<210> 82

10

20

30

40

<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer
<400> 82
atcgagctcg tcaaccag 18 10
<210> 83
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer
<400> 83 20
atcgaggctcg tcaaccag 18
<210> 84
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer 30
<400> 84
ggcggggcgc ccgcaagc 18
<210> 85
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220> 40
<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 85

ggcgggtgc ccgcaagc

18

<210> 86

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 86

ggcgggtgc ccgcaagc

18

<210> 87

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 87

gtgggtgggt tctccacc

18

<210> 88

<211> 18

<212> DNA

30

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 88

cgcgcgctgt acgtgcgc

18

<210> 89

<211> 18

40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 89

cgcgcggtggt acgtgcgc

18

<210> 90

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 90

aacggcgagg gcgagtgc

18

<210> 91

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 91

aacggcgatg gcgagtgc

18

<210> 92

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 92

aacggcaagg gcgagtgc

18

10

20

30

40

<210> 93

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 93

aacggccggg gcgagtgc

18

<210> 94

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 94

aacggcaacg gcgagtgc

18

<210> 95

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 95

aacggctcgg gcgagtgc

18

<210> 96

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

20

30

40

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 96

aacggcgggg gcgagtgc

18

<210> 97

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 97

tactacggct gctgggag

18

【図面の簡単な説明】

【図 1】プラスミド p P T - D B 1 の制限酵素切断点地図を示す。

【符号の説明】

20

b l a : - ラクタマーゼをコードする遺伝子を示す。

C o l E 1 - o r i : C o l E 1 系の複製開始部位を示す。

l a c Z : p U C 1 8 由来のラクトースオペロンのプロモーターおよびオペレーター領域を示す。

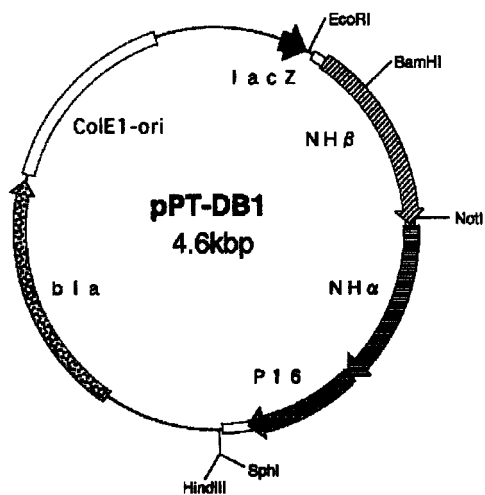
N H : シュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼの サブユニットをコードする遺伝子を示す。

N H : シュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼの サブユニットをコードする遺伝子を示す。

P 1 6 : シュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼの活性化に関するタンパク質をコードする遺伝子を示す。

30

【 図 1 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 9/88	C 1 2 P 13/00	
C 1 2 P 13/00	C 1 2 N 5/00	A

(72)発明者 番場 伸一
千葉県袖ヶ浦市長浦 5 8 0 - 3 2 三井化学株式会社内

(72)発明者 伊藤 潔
千葉県茂原市東郷 1 1 4 4 三井化学株式会社内

F ターム(参考) 4B024 AA03 BA07 CA03 DA06 EA04 GA11 HA01
4B050 CC01 DD02 EE10 LL05
4B064 AE01 CA02 CA21 CB30 CC24 CD12 DA16
4B065 AA01Y AA26X AB01 AC14 BA02 CA27