

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-537726

(P2007-537726A)

(43) 公表日 平成19年12月27日(2007.12.27)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024
C12N 9/88 (2006.01)	C12N 9/88	4B050
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4B064
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	4B065
C12N 1/21 (2006.01)	C12N 1/21	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-504303 (P2007-504303)
 (86) (22) 出願日 平成17年3月14日 (2005.3.14)
 (85) 翻訳文提出日 平成18年10月17日 (2006.10.17)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2005/002689
 (87) 国際公開番号 W02005/090394
 (87) 国際公開日 平成17年9月29日 (2005.9.29)
 (31) 優先権主張番号 102004013847.8
 (32) 優先日 平成16年3月20日 (2004.3.20)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

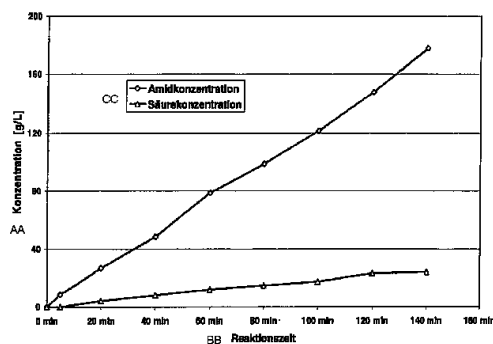
(71) 出願人 501073862
 デグサ ゲーエムペーハー
 Degussa GmbH
 ドイツ連邦共和国 デュッセルドルフ ベ
 ニクゼンプラッツ 1
 Bennigsenplatz 1, D
 -40474 Duesseeldorf,
 Germany
 (74) 代理人 100061815
 弁理士 矢野 敏雄
 (74) 代理人 100094798
 弁理士 山崎 利臣
 (74) 代理人 100099483
 弁理士 久野 琢也

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 シアン耐性ニトリルヒドラターゼ

(57) 【要約】

本発明は、高められたシアン耐性を有するシュードモナス属の微生物由来のシアン耐性ニトリルヒドラターゼ、シアン化合物の存在下にアミドからニトリルを製造するための方法並びに前記酵素をコードするポリヌクレオチド配列及び前記酵素に関する。



AA...CONCENTRATION
 BB...REACTION TIME
 CC...AMIDE CONCENTRATION
 ACID CONCENTRATION

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列番号 2 と 3 と 5 又は配列番号 7 と 8 と 10 の配列中に含まれるアミノ酸配列と 90 ~ 100 % まで同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 2】

請求項 1 記載のポリヌクレオチドであって、

a) 配列番号 1、4、6、9 のヌクレオチド配列又はそれに相補的なヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド、

b) 遺伝子コードの縮重の範囲で a) の配列に相当するヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド、

c) a) によるヌクレオチド配列であって機能的に中立な同義突然変異を有するヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド、

d) a) からの相補配列と、5 x SSC 中で 50 ~ 65 の温度で洗浄するというストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド

の群から選択され、その際、シアン耐性ニトリルヒドラーゼをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 3】

配列番号 2 と 3 と 5 又は配列番号 7 と 8 と 10 の配列を有する配列と 90 ~ 100 % まで同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチド。

【請求項 4】

請求項 3 記載のシアン耐性ニトリルヒドラーゼの活性を有するポリペプチドであって、その残留活性が、メタクリルニトリルを 20 mM (mM = ミリモル / l) のシアン化物イオンの存在下で 20 で反応させた 30 分後に、その酵素を同じ条件下にシアン化物イオンの不在下で反応について評価した場合の酵素の残留活性の少なくとも 90 % の残留活性であるポリペプチド。

【請求項 5】

配列番号 1、4、6、9 の配列からの少なくとも 20 の連続したヌクレオチドを有するプローブ又はプライマー。

【請求項 6】

請求項 1 又は 2 記載のポリヌクレオチドから選択されるポリヌクレオチドを有するベクター。

【請求項 7】

請求項 1 又は 2 記載のポリヌクレオチドの導入により形質転換又はトランスフェクションされた宿主細胞。

【請求項 8】

請求項 6 記載のベクターの導入により形質転換された宿主細胞。

【請求項 9】

ニトリルからアミドを酵素により製造するための方法において、以下の工程：

a) ニトリル基を有する化合物と、ニトリルヒドラーゼ活性を有する微生物酵素 (ポリペプチド) とを反応させる工程、及び

b) 形成したアミドを分離する工程

を有し、その際、ニトリルを転化させてアミドにするために、請求項 3 又は 4 記載のシアン耐性ニトリルヒドラーゼを使用する方法。

【請求項 10】

請求項 9 記載の方法において、請求項 7 又は 8 記載の酵素を産生しかつ含有する微生物又はその溶解物を使用することを特徴とする方法。

【請求項 11】

請求項 10 記載の方法において、微生物の休止細胞を使用することを特徴とする方法。

【請求項 12】

10

20

30

40

50

請求項 9 記載の方法において、精製されたニトリルヒドラーゼを使用することを特徴とする方法。

【請求項 13】

請求項 9 から 12 までのいずれか 1 項記載の方法において、酵素が、シュードモナス属の微生物に由来するものであることを特徴とする方法。

【請求項 14】

請求項 13 記載の方法において、酵素が、シュードモナス・プチダ又はシュードモナス・マルギナリスの種の使用される微生物に由来するものであることを特徴とする方法。

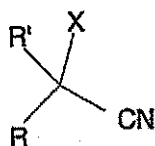
【請求項 15】

請求項 14 記載の方法において、使用される微生物が、番号 D S M 1 6 2 7 5 及び D S M 1 6 2 7 6 として寄託されていることを特徴とする方法。 10

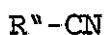
【請求項 16】

請求項 9 から 15 までのいずれか 1 項記載の方法において、一般式

【化 1】



20



(II)

[式中、

X は、OH、H、アルキル、NH₂ を意味し、

R は、H、1 ~ 12 個の炭素原子を有し、分枝鎖状又は非分枝鎖状の、NH₂ で置換されていてよい飽和アルキル基、1 個の二重結合と 1 ~ 12 個の炭素原子を有し、分枝鎖状又は非分枝鎖状の不飽和アルキル基、3 ~ 6 個の炭素原子を有するシクロアルキル基、アルキルチオ基で置換されたアルキレン基であってそのアルキル基がここでは C₁ ~ C₃ - 基に相当しかつそのアルキレンが二価の C₃ ~ C₈ - 基に相当する基を意味し、 30

R は、H、1 ~ 3 個の炭素原子を有するアルキルを意味し、

R は、6 ~ 12 個の炭素原子を有し、1 又は 2 個のアルキル基 (C₁ ~ C₃)、Cl、Br、F で置換されていてよい一核もしくは二核の不飽和環、1 ~ 6 個の炭素原子を有するアルキルニトリル基を意味する] の化合物を転化させて、相応のアミドを得ることを特徴とする方法。

【請求項 17】

請求項 16 記載の方法において、一般式 (I) の化合物を、青酸又は青酸の塩の存在下で反応させることを特徴とする方法。

【請求項 18】

請求項 17 記載の方法において、転化を、使用されるニトリルに対して、0.5 モル % より高く 3 モル % までの出発濃度のシアン化合物の存在下で実施することを特徴とする方法。 40

【請求項 19】

請求項 9 から 18 までのいずれか 1 項記載の方法において、ニトリルとして、2 - アミノ - 4 - メチルチオブチロニトリルを使用することを特徴とする方法。

【請求項 20】

請求項 9 から 18 までのいずれか 1 項記載の方法において、ニトリルとして、2 - ヒドロキシ - 4 - メチルチオブチロニトリルであって該ニトリルの製造からの反応混合物中に含まれていてよいニトリルを使用することを特徴とする方法。 50

【請求項 2 1】

請求項 9 から 1 8 までのいずれか 1 項記載の方法において、ニトリルとして、2 - ヒドロキシ - 2 - メチルプロピオニトリルを使用することを特徴とする方法。

【請求項 2 2】

請求項 9 から 2 1 までのいずれか 1 項記載の方法において、アミドもしくはアミド含有溶液からバイオマスの細胞を分離し、そしてそのアミドを酸化する、相応の酸にすることを特徴とする方法。

【請求項 2 3】

請求項 9 から 2 1 までのいずれか 1 項記載の方法において、アミドもしくはアミド含有溶液からバイオマスの細胞を分離し、そしてそのアミドをアルカリ金属水酸化物又はアルカリ土類金属水酸化物により酸化する、相応のカルボン酸の塩にすることを特徴とする方法。

10

【請求項 2 4】

請求項 2 3 記載の方法において、MHA - アミドを水酸化カルシウムで酸化する、そしてカルシウム塩を得ることを特徴とする方法。

【請求項 2 5】

請求項 9 から 2 4 までのいずれか 1 項記載の方法において、

a) シュードモナス属の微生物を発酵させるにあたり、それを、単離されたポリヌクレオチドであって配列番号 2、3、5、7、8、10 の配列を有する配列中に含まれるアミノ酸配列と 90 ~ 100 % まで同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードしそのポリペプチドがシアン耐性ニトリルヒドラーゼの活性を有する単離されたポリヌクレオチドを、増強し、特に組み換えにより過剰発現させて行い、

20

b) これらの微生物から、ニトリルヒドラーゼ活性を有する組み換えにより作製された酵素を場合により単離するか又はこの酵素を含有するタンパク質分画を製造し、そして

c) a) による微生物又は b) による酵素又はこの酵素を含有するタンパク質分画を、一般式 (I) 及び (II) のニトリル基含有化合物を含有する培地に移すことを特徴とする方法。

【請求項 2 6】

請求項 9 から 2 4 までのいずれか 1 項記載の方法において、請求項 7 又は 8 記載の宿主細胞を使用することを特徴とする方法。

30

【請求項 2 7】

番号 DSM 16275 及び DSM 16276 として寄託されている、シュードモナス属の微生物。

【請求項 2 8】

番号 DSM 16275 及び DSM 16276 として寄託されているシュードモナス属の菌株から単離されたシアン耐性ニトロヒドラーゼ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、特に、高められたシアン耐性を有するシュードモナス・プチダ株又はシュードモナス・マルギナリス株由来のシアン耐性ニトリルヒドラーゼ、それをシアン化合物の存在下でニトリルからアミドを製造するために用いる使用及び前記酵素をコードするポリヌクレオチド配列に関する。

40

【0002】

- ヒドロキシニトリル (シアンヒドリン) 及び - アミノニトリルをニトリルヒドラーゼを用いて相応のアミドに転化させることは、- ヒドロキシ酸及び - アミノ酸を合成する新規の変法を与える。それというのも - ヒドロキシアミド及び - アミノアミドは、容易に酸化するからである (メチオニンの製造方法及びそのための触媒 (Process and catalysts for the production of methionine. Ponceblanc, Herve; Rossi, Jean-Christophe; Laval, Philip; Gros, Georges. (Rhone-Poulenc Animal Nutri

50

tion SA, Fr.), (WO 2001060789号)。代替的に、 α -ヒドロキシアミドとアルカリ金属水酸化物又はアルカリ土類金属水酸化物とを反応させて、相応のヒドロキシ酸の塩にすることもできる。この場合に特に、4-メチルチオ- α -ヒドロキシブチルアミド(MHA-アミド)と水酸化カルシウムとを反応させることが好ましい。それというのも、カルシウム-MHAはメチオニンの代替生成物形として直接使用でき、又はMHAは飼料添加物として使用することができるからである。

【0003】

しかしながら、 α -ヒドロキシニトリル及び β -アミノニトリルは容易に分解して、アルデヒドと青酸あるいはアルデヒドと、青酸と、アンモニアとなる。生成する青酸は、ほぼ全ての公知のニトリルヒドラーゼにとっての強力なインヒビターであるが、ロドコッカス・エクイXL-1由来のニトリルヒドラーゼは例外であり、そのニトリルヒドラーゼは、20mMのシアン化合物で、今まで知られたなかで最も低い活性損失を示す(シアン耐性ニトリルヒドラーゼを有するロドコッカス・エクイ細胞によるニトリルからのアミドの製造(Production of amides from nitriles by Rhodococcus equi cells having a cyanide resistant-nitrile hydratase). Nagasawa, Tohru; Matsuyama, Akinobu. (Daicel Chemical Industries, Ltd., Japan)、(EP 1266962A号))。

10

【0004】

休止細胞の生体乾燥質量1gあたり約8gのアミドという低い生産性と、43時間という長い反応時間と、75g/Lという比較的低い生成物濃度のため、改善されたニトリルヒドラーゼの探求に導かれる。

20

【0005】

従って、本発明の目的は、前記の制限下でない生体触媒を提供することである。更に、該生体触媒がシアン化合物に対して更に高い耐性があることが好ましい。それというのも、 α -ヒドロキシニトリル及び β -アミノニトリルは、迅速かつ完全なアルデヒドの反応を保証するために、生成物中に部分的に残留する青酸が、有利には1~3%過剰で製造されるからである。従って、生体内変換の間に、20mMを上回るシアン化合物濃度を有することがある。副生成物及び試薬、例えば補助塩基として使用されるアミンも同じく、ニトリルヒドラーゼ活性を阻害してはならない。

【0006】

本発明の課題は、ニトリルからアミドへの転化に際して反応溶液中に存在するシアン化合物イオンに対して、高められた安定性を有するニトリルヒドラーゼを提供することである。

30

【0007】

本発明の対象は、特にシュードモナス属の微生物由来の単離されたポリヌクレオチドであって、配列番号2、3、5、7、8、10の配列に含まれるアミノ酸配列と90~100%まで同一なアミノ酸配列を有するポリペプチドであり配列番号2、3、5又は配列番号7、8、10の配列を有するポリペプチドが、共にそれぞれシアン耐性ニトリルヒドラーゼの活性を有し、あるいはこれらのニトリルヒドラーゼを形成するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである。

【0008】

該ポリヌクレオチドが、シュードモナス・プチダ又はシュードモナス・マルギナリスに由来することが好ましい。

40

【0009】

本発明の対象は、

- a) 配列番号1、4、6、9からのヌクレオチド配列又はそれに相補的なヌクレオチド配列を有するか又は該配列からなるポリヌクレオチド、
- b) 遺伝子コードの縮重の範囲でa)の配列に相当するヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド、
- c) a)によるヌクレオチド配列であって機能的に中立な同義突然変異を有するヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド、

50

d) a) 又は c) からの相補配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド

の群から選択される他のポリヌクレオチドであって、シアン耐性ニトリルヒドラターゼをコードするポリヌクレオチドである。

【0010】

また本発明の対象は、前記のポリヌクレオチドによってコードされ、配列番号2、3、5又は配列番号7、8、10の配列を有し、シュードモナス属の微生物由来のシアン耐性ニトリルヒドラターゼの活性を有するポリペプチドであって、微生物中に蓄積されてか又は単離された形で存在しうるポリペプチドである。配列番号2及び配列番号7は、ニトリルヒドラターゼの - サブユニットをコードし、配列番号3及び配列番号8は、ニトリルヒドラターゼの - サブユニットをコードし、配列番号5及び配列番号10は、ニトリルヒドラターゼの活性のために同時発現することが必須であるアクチベータータンパク質をコードする (Nojiri et al., 1999, Journal of Biochemistry, 125:696-704)。

10

【0011】

本発明によれば、本発明によるポリヌクレオチドによって形質転換又はトランスフェクションされた宿主細胞を使用することが好ましい。

【0012】

宿主細胞には、特に安定な発現系が知られている真核生物又は原核生物を数えることができる。

【0013】

宿主生物としては、発現系のために挙げられる有利な微生物、例えばシュードモナス、ピチア、種々異なる酵母、サッカロマイセス、アスペルギルス又はストレプトマイセス科、特に大腸菌が用いられる。ロドコッカス属の微生物も同様に適している。

20

【0014】

ベクターDNAは、真核細胞又は原核細胞中に、公知の形質転換技術又はトランスフェクション技術により導入することができる。

【0015】

“形質転換”、“トランスフェクション”、“接合”及び“遺伝子導入”とは、異種DNAを導入するための先行技術により知られる処置を指す。

【0016】

また本発明の対象は、シュードモナス・マルギナリス又はシュードモナス・プチダからの完全な遺伝子又はその一部を含む相応の遺伝子バンクと、本発明による配列番号1、4又は配列番号6、9からなるポリヌクレオチド又はその断片を有するプローブとをハイブリダイズさせることによりスクリーニングし、そして挙げられるポリヌクレオチド配列を単離することによって得られるポリヌクレオチド配列から主になっているポリヌクレオチドである。

30

【0017】

本発明による配列を有するポリヌクレオチドは、RNA、cDNA及びDNAのためのハイブリダイゼーションプローブとして、本発明によるタンパク質をコードする核酸あるいはポリヌクレオチド又は遺伝子を全長で単離するか又は本発明による遺伝子の配列と高い配列相似性を有する核酸あるいはポリヌクレオチド又は遺伝子を単離するために適している。また該ポリヌクレオチドは、いわゆる“アレイ”、“マイクロアレイ”又は“DNAチップ”上に適用することができ、そこで相応のポリヌクレオチド又はそこから導き出される配列、例えばRNA又はcDNAの検出及び決定がなされる。

40

【0018】

本発明による配列を有するポリヌクレオチドは、更に、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)で本発明によるタンパク質をコードする遺伝子のDNAを作製できるプライマーとして適している。

【0019】

プローブ又はプライマーとして用いられるかかるオリゴヌクレオチドは、少なくとも2

50

5又は30の、有利には少なくとも20の、殊に有利には少なくとも15の連続したヌクレオチドを有する。同様に、少なくとも40又は50のヌクレオチド長を有するオリゴヌクレオチドが適している。場合により、少なくとも100、150、200、250又は300のヌクレオチド長を有するオリゴヌクレオチドも適している。

【0020】

“単離された”とは、その自然な環境から切り離されたことを意味する。

【0021】

“ポリヌクレオチド”は、一般に、改変されていないRNAもしくはDNA又は改変されたRNAもしくはDNAであってよいポリリボヌクレオチド及びポリデオキシリボヌクレオチドを指す。

10

【0022】

本発明によるポリヌクレオチドは、配列番号1、4、6、9によるポリヌクレオチド又はそこに含まれる断片と、その配列番号1、4、6、9によるポリヌクレオチド又はそこに含まれる断片と少なくとも90%、93%、95%、97%又は99%同一であるものを包含する。

【0023】

“ポリペプチド”とは、ペプチド結合を介して結合した2つ又はそれ以上のアミノ酸を有するペプチド又はタンパク質を表す。

【0024】

本発明によるポリペプチドは、配列番号2、3、5、7、8、10によるポリペプチドと、その配列番号2、3、5、7、8、10によるポリペプチドと少なくとも90%、特に有利には少なくとも91%、95%、97%又は99%同一であるものを包含する。

20

【0025】

所望の遺伝子バンクから得られたDNA配列を、次いで公知のアルゴリズム又は配列解析プログラムを用いて、例えばStaden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986))、Mark (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988))によるプログラム、又はButler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998))によるGCG-プログラムにより調査することができる。

【0026】

配列番号1、4、6、9の配列に含まれる配列の遺伝子コードの縮重によって得られたコーディングDNA配列も同様に本発明の要素である。同様に、前記の配列又はその一部とハイブリダイズするDNA配列も本発明の要素である。当業界においては、更に、タンパク質中での保存的アミノ酸置換、例えばグリシンとアラニンの置換又はアスパラギン酸とグルタミン酸の置換は、“同義突然変異”(“sense mutations”)として知られ、この置換は、タンパク質活性の根本的变化をもたらさず、すなわち機能的に中立である。更に、タンパク質のN-末端及び/又はC-末端での変化が、その機能を実質的に損ねず又はそれどころか安定化できることは知られている。当業者は、それらの説明を、とりわけBen-Bassat他 (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987))で、O'Regan他 (Gene 77:237-251 (1989))で、Sahin-Toth他 (Protein Sciences 3:240-247 (1994))で、Hochuli他 (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988))で、かつ遺伝学と分子生物学の公知の教科書において見出す。

30

40

【0027】

最後に、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって、配列番号1、4、6、9から得られるプライマーを使用して作製されるDNA配列は本発明の要素である。かかるオリゴヌクレオチドは、一般に、少なくとも15の連続したヌクレオチドの長さを、特に20、30又は40の連続したヌクレオチドの長さを有する。

【0028】

当業者は、ハイブリダイゼーションによるDNA配列の同定の手引きを、とりわけベリンガーマンハイムGmbH社のマニュアル“フィルタハイブリダイゼーションのためのDIGシステム利用者手引き(The DIG System Users Guide for Filter Hybridization

50

) ” (ドイツ・マンハイム在、1993年) において、そして Liebl 他 (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260) で見出す。ハイブリダイゼーションは、ストリンジェントな条件下で実施される、すなわち、プローブと目的配列、つまりそのプローブで処理されるポリヌクレオチドとが少なくとも90%同一である場合にのみハイブリッドが形成される。洗浄工程を含むハイブリダイゼーションのストリンジェンシーが、バッファー組成の変更、温度変更及び塩濃度変更によって左右されあるいは規定されることは公知である。ハイブリダイゼーション反応は、洗浄工程に対して比較的低いストリンジェンシーで実施することが好ましい (Hybaid社ハイブリダイゼーションガイド (Hybaid Hybridisation Guide)、Hybaid 有限会社 (Hybaid Limited)、英国・テディントン在、1996年)。

10

【0029】

ハイブリダイゼーション反応のためには、例えば5×SSCバッファーは、約50～68の温度で使用することができる。この場合に、プローブは、プローブの配列に対して70%未満の同一性を有するポリヌクレオチドともハイブリダイズすることができる。かかるハイブリッドは、あまり安定ではなく、そしてストリンジェントな条件下で洗浄によって取り除かれる。このことは、例えば塩濃度を2×SSCにまで下げ、場合により引き続き0.5×SSCにまで下げることによって、その際に温度を約50～68に調整して達成することができる (フィルタハイブリダイゼーションのためのDIGシステム利用者手引き (The DIG System Users Guide for Filter Hybridization)、ベーリンガーマンハイム社 (ドイツ・マンハイム在、1995年))。場合により、塩濃度を0.1

20

【0030】

当業者は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いたDNA配列の増幅のための手引きを、特に、Gaitによるマニュアル：オリゴヌクレオチド合成 (Oligonucleotide synthesis) : 実際のアプローチ (a practical approach) (IRL出版 (IRL Press)、英国

30

【0031】

一般的に行われるのは、良好に発現可能な遺伝子は低コピー数を有するベクター中にクローニングし、より弱い発現能力を有する遺伝子はより高いコピー数及び/又は強力なプロモーターを有するベクター上でクローニングすることである。宿主細胞は、前記のベクターで形質転換されており、こうして該細胞は、出発生物と比較して、ニトリルヒドラーゼの形成をコードする付加的なヌクレオチド配列コピーを少なくとも各々有する。

【0032】

こうして作製された、特にシュードモナス属の形質転換された微生物又は組み換え微生物も同様に本発明の一部である。

40

【0033】

本発明によるニトリルヒドラーゼとヘルパータンパク質P47Kをコードする遺伝子を微生物において増強することによって、ニトリルヒドラーゼの産生向上がもたらされ、又はニトリルヒドラーゼの活性増大ももたらされる。

【0034】

概念“増強”とは、この関連においては、微生物中で相応のDNAによってコードされる1種又はそれ以上の酵素の細胞内活性を、例えば1種あるいは複数の遺伝子のコピー数を高めるか、強力なプロモーターを使用するか、又は高い活性を有する相応の酵素をコー

50

ドする遺伝子を使用し、そして場合によりこれらの処置を組み合わせて、組み換えられていない発生物と比較して高めることを説明している。

【0035】

過剰発現の達成のために、構造遺伝子の上流にあるプロモーター領域及び調節領域又はリボソーム結合部位を突然変異させることができる。構造遺伝子上流に組み込まれる発現カセットが同様にはたらく。更に、誘導可能なプロモーターによって、発酵によるアミノ酸産生の過程において発現を増大させることも可能である。m-RNAの寿命の延長のための処置によっても同様に、発現は改善される。

【0036】

更に、酵素タンパク質の分解の防止によっても同様に、酵素活性は増強される。遺伝子又は遺伝子構築物は、種々異なるコピー数を有するプラスミド中に存在するか又は染色体に組み込まれそして増幅されうる。更に代替的に、当該遺伝子の過剰発現は、培地組成及び培養操作の変更によって達成することができる。

【0037】

同様に以下も本発明の対象である。

【0038】

1) ニトリルからアミドを酵素により製造する方法において、以下の工程：

a) ニトリル基を有する化合物と、ニトリルヒドラーゼ活性を有する微生物の酵素とを反応させる工程と、

b) 形成されたアミドを分離する工程とを有し、その際、

c) ニトリルからアミドへの反応のために、本発明によるニトリルヒドラーゼを使用する方法。その酵素の残留活性は、メタクリルニトリルを20 mM (mM = ミリモル/l) のシアン化物イオンの存在下で20 で反応させた30分後に、その酵素を同じ条件下にシアン化物イオンの不在下で反応に使用した場合の酵素の残留活性の少なくとも90%の残留活性であることが好ましい。

【0039】

2) 1) による方法において、50 mMのシアン化物イオンの存在下で反応させた後の残留活性が少なくとも60%であることを特徴とする方法。

【0040】

3) 1) 又は2) による方法において、酵素を産生しかつ含有する微生物又はその溶解物を使用することを特徴とする方法。

【0041】

4) 3) による方法において、微生物の休止細胞を使用することを特徴とする方法。

【0042】

5) 1) 又は2) による方法において、精製酵素を使用することを特徴とする方法。

【0043】

6) 1) ないし5) による方法において、酵素が、シュードモナス属の微生物、特にシュードモナス・プチダ又はシュードモナス・マルギナリスに由来することを特徴とする方法。

【0044】

7) 6) による方法において、酵素が、シュードモナス属の微生物であって番号DSM 16275及びDSM 16276として寄託されている微生物に由来し、かつ配列番号2、3、5、7、8、10の配列を有するアミノ酸配列を有することを特徴とする方法。

【0045】

8) 1) ないし7) の1つ又はそれ以上による方法において、一般式

【0046】

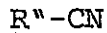
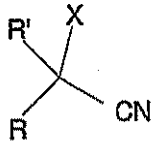
10

20

30

40

【化1】



10

[式中、

Xは、OH、H、1～4個の炭素原子を有するアルキル、NH₂を意味し、
 Rは、H、1～12個の炭素原子を有し分枝鎖状もしくは非分枝鎖状であってNH₂で置換されていてよい飽和アルキル基、1つの二重結合を有しかつ1～12個の炭素原子を有し分枝鎖状もしくは非分枝鎖状の不飽和アルキル基、3～6個の炭素原子を有するシクロアルキル基、アルキルチオ基で置換されたアルキレン基であってそのアルキルがC₁～C₃-基に相当しかつそのアルキレンが二価のC₃～C₈-基に相当する基を意味し、
 R'は、H (RがHを意味しない場合に)、1～3個の炭素原子を有するアルキルを意味し、

20

R''は、6～12個の炭素原子を有し1もしくは2つのアルキル基(C₁～C₃)、Cl、Br、Fで置換されていてよい一核もしくは二核の不飽和環、1～6個の炭素原子を有する一価のアルキルニトリル基を意味する]で示される化合物を転化させて、相応のアミドを得ることを特徴とする方法。

【0047】

9)8)による方法において、一般式(I)の化合物を青酸又は青酸の塩の存在下で反応させることを特徴とする方法。

【0048】

10)9)による方法において、反応を、使用されるニトリルに対して0.1モル%のシアン化合物ないし3モル%のシアン化合物、有利には>2～3モル%のシアン化合物の存在下に実施することを特徴とする方法。このことは、1モルの最終濃度で、3モル%の場合に30ミリモルのシアン化合物に相当する。

30

【0049】

11)1)ないし10)の1つ又はそれ以上による方法において、ニトリルとして、メチオニンニトリルを使用することを特徴とする方法。

【0050】

12)1)ないし10)の1つ又はそれ以上による方法において、ニトリルとして、2-ヒドロキシ-4-メチルチオプロピロニトリルを使用することを特徴とする方法。

【0051】

青酸、3-メチルチオプロピオンアルデヒドを、補助塩基、例えばトリエチルアミンの存在下で、先行技術に従って反応させて得られる反応混合物を使用することが好ましい。

40

【0052】

該混合物は、有利には後精製することなく使用することができる。

【0053】

このことは、本発明による酵素がアルデヒドとアミンに対して付加的に安定性があることを指示している。

【0054】

13)メタクリルアミドのための前駆物質として、2-ヒドロキシ-2-メチルプロピオニトリルを使用する方法。

【0055】

50

14) 本発明は、同様に、シュードモナス属であって番号DSM16275(MA32、シュードモナス・マルギナリス)及びDSM16276(MA113、シュードモナス・プチダ)として寄託されている単離と精製がなされた微生物にならうものである。

【0056】

15) シュードモナス属の菌株、特に番号DSM16275及びDSM16276として寄託されているシュードモナス・プチダ及びシュードモナス・マルギナリスの菌株から単離されたシアン耐性ニトリルヒドラーゼ。

【0057】

その寄託は、2004年3月9日に、DSMZ(ドイツ微生物細胞培養コレクション)(ブラウンシュバイク在)にてブタペスト条約に従って行った。

【0058】

これらの菌株は、本発明による酵素を産生するのに特に適している。

【0059】

“単離と精製がなされた微生物”は、天然にみられるより高い濃度で存在する微生物に関連する。

【0060】

また本発明の対象は、前記のシアン耐性ニトリルヒドラーゼの製造方法において、

a) 前記ニトリルヒドラーゼを産生する微生物、特にシュードモナス・マルギナリス又はシュードモナス・プチダといったシュードモナス属の微生物を、該酵素がその微生物中に形成される条件下で発酵させ、そして

b) 対数増殖期の完了後できるだけ早期に細胞を回収する方法である。

【0061】

引き続き、

a) 酵素を含有する微生物を、休止細胞の形で、場合により細胞膜の透過性を高めた後でか、又は

b) 細胞の溶解物を、又は

c) 微生物の細胞から公知の処置で単離された酵素を、

そのいずれかを、ニトリルからアミドへの本発明による転化に使用する。

【0062】

そのニトリルヒドラーゼは、組み換えられていない微生物により産生された酵素でも組み換え微生物により産生された酵素でもよい。

【0063】

更に本発明の対象は、本発明によるポリペプチドの組み換えによる製造方法において、このポリペプチドを産生する微生物を培養し、場合により関連するポリヌクレオチドの発現を誘導し、そして該酵素を場合により培養から単離する方法である。

【0064】

一般には、

a) 特にシュードモナス・マルギナリス又はシュードモナス・プチダといったシュードモナス属の微生物を発酵させるにあたり、それを、シュードモナスの科の微生物由来の単離されたポリヌクレオチドであって配列番号2と3と5又は配列番号7と8と10中の配列を含むアミノ酸配列と90~100%まで同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードしそのポリペプチドがそれぞれ共通してシアン耐性ニトリルヒドラーゼの活性を有するポリヌクレオチドを、増強し、特に組み換えにより過剰発現させて行い、

b) これらの微生物から、ニトリルヒドラーゼ活性を有する酵素を場合により単離するか又はこの酵素を含有するタンパク質分画を製造し、そして

c) a) による微生物又はb) による酵素又はこの酵素を含有するタンパク質分画を、一般式(I)及び(II)のニトリル基含有化合物を含有する培地に移す方法である。

【0065】

発酵に使用される培養培地は、適宜、その都度の菌株の要求を満たさねばならない。様々な微生物の培養培地の説明は、米国微生物学学会(American Society for Bacteriolog

10

20

30

40

50

y) のマニュアル “一般的な細菌学の方法のマニュアル (Manual of Methods for General Bacteriology)” (米国・ワシントン D. C.、1981年) に含まれている。

炭素源として、糖及び炭水化物、例えばグルコース、サッカロース、ラクトース、フルクトース、マルトース、糖蜜、デンプン及びセルロース、油脂、例えば大豆油、ヒマワリ油、ピーナツ油、ヤシ脂、脂肪酸、例えばパルミチン酸、ステアリン酸及びリノール酸、アルコール、例えばグリセリン及びエタノール、及び有機酸、例えば酢酸を使用することができる。これらの物質は、単独で又は混合物として使用することができる。

【0066】

窒素源としては、有利には、有機ニトリル又は酸アミド、例えばアセトニトリル、アセトアミド、メタクリルニトリル、メタクリルアミド、イソブチロニトリル、イソブチルアミド又は尿素を使用することができ、また他の窒素含有化合物、例えばペプトン、酵母エキス、肉エキス、麦芽エキス、コーンステープリカー、大豆粉との組み合わせで、及び/又は無機化合物、例えば硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、炭酸アンモニウム及び硝酸アンモニウムを使用することができる。前記窒素源は、単独で又は混合物として使用してよい。

10

【0067】

リン源として、リン酸、リン酸水素カリウム又はリン酸水素二カリウム又はこの相応するナトリウム含有塩を使用することができる。前記培養培地は更に、金属塩、例えば硫酸マグネシウム又は硫酸鉄を含有することが必要であり、これらは成長に必要である。最後に、必須栄養成長物質、例えばアミノ酸及びビタミンを上述の物質に加えて使用してよい。

20

【0068】

前記培養物の pH 調節のために、塩基性化合物、例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア、又はアンモニア水、又は酸性化合物、例えばリン酸、又は硫酸が適宜使用される。気泡発生の制御のために、消泡剤、例えば脂肪酸ポリグリコールエステルを使用してよい。好気条件を維持するために、酸素又は酸素含有のガス混合物、例えば空気を培養に導入する。培養温度は、通常では、10 ~ 40 であり、有利には 10 ~ 30 である。培養は、対数増殖期が完了するまで続ける。この目標は、通常では、10 時間 ~ 70 時間の間に達成される。これに引き続き、細胞を、有利には、回収し、洗浄し、バッファー中に懸濁液として pH 値 6 ~ 9、特に 6.8 ~ 7.9 で取り込む。その細胞濃度は、1 ~ 25 %、特に 1.5 ~ 15 % (湿分質量 / 容量) に達する。透過性は、物理的又は化学的な方法により、例えばトルエンを用いて、例えば Wilms et al., J. Biotechnol., 86 巻 (2001), 19-30 で記載されるように、この転化すべきニトリルが細胞壁を透過してアミドが流出できるように高めることができる。

30

【0069】

以下のニトリルを転化させることが好ましい：

飽和モノニトリル：

アセトニトリル、プロピオニトリル、ブチロニトリル、イソブチロニトリル、バレロニトリル、イソバレロニトリル、カプロニトリル

40

飽和ジニトリル：

マロンニトリル、スクシノニトリル、グルタロニトリル、アジポニトリル

芳香族の非置換及び置換のモノニトリル及びジニトリル：

ベンゾニトリル、2, 6 - ジフルオロベンゾニトリル、フタロニトリル、イソフタロニトリル、テレフタロニトリル

- アミノニトリル：

- アミノプロピオニトリル、 - アミノメチルチオブチロニトリル、 - アミノブチロニトリル、アミノアセトニトリル、天然アミノ酸から導き出される全てのニトリル、 - アミノ - 3, 3 - ジメチルプロピオニトリル、 - アミノ - 2, 3 - ジメチルプロピオニトリル

50

カルボキシル基を有するニトリル：

シアノ酢酸

- アミノニトリル：

アミノ - 3 - プロピオニトリル

不飽和ニトリル：

アクリルニトリル、メタクリロニトリル、アリルシアニド、クロトノニトリル

- ヒドロキシニトリル：

- ヒドロキシ - n - プロピオニトリル、 - ヒドロキシ - n - ブチロニトリル、 - ヒドロキシ - イソブチロニトリル、 - ヒドロキシ - n - ヘキサノニトリル、 - ヒドロキシ - n - ヘプタノニトリル、 - ヒドロキシ - n - オクタノニトリル、 - ジヒドロキシ - , - ジメチルブチロニトリル、アクロレインシアノヒドリン、メタクリルアルデヒド シアノヒドリン、3 - クロロラクトニトリル、4 - メチルチオ - - ヒドロキシブチロニトリル及び - ヒドロキシ - フェニルプロピオニトリル。

10

【0070】

転化させるべきニトリルの反応溶液中での濃度は、規定の範囲に制限されない。

【0071】

基質による酵素活性の阻害を回避するために、ニトリルの濃度は、一般には、乾燥細胞質量としての生体内触媒の量に対して、0.02 ~ 10質量%、特に0.1 ~ 2質量%に保持される。基質は、転化開始時に全体を添加することができ又は転化の過程において連続的にもしくは断続的に添加することができる。

20

【0072】

乾燥質量の測定は、湿分分析器 (Moisture Analyser) M A 4 5 型 (ザルトリウス社)で行われる。

【0073】

水性反応系へのニトリル化合物の溶解度が低すぎる場合には、溶解補助剤を添加してよい。

【0074】

しかしながら代替的に、その反応を、水 / 有機溶剤の二相系で実施することもできる。

【0075】

微生物の細胞を酵素活性物質として使用する場合には、使用される細胞の量は、基質量に対して、乾燥細胞質量として有利には0.02 ~ 10質量%である。

30

【0076】

また、単離された酵素を、一般に知られる技術に従って固定化し、そしてその形で使用することも可能である。

【0077】

反応は、一般には、- 5 ~ 50、特に0 ~ 30の温度で、かつ0.1 ~ 100時間の時間で実施される。

【0078】

保持されるべき反応混合物のpH値は、酵素活性が損なわれない限りは一定の範囲に制限されない。転化の後に、形成されたアミドを、反応溶液から公知のように分離し、精製してよい。

40

【0079】

また本発明の対象は、アミドもしくはアミドを含有する溶液を、例えばバイオマスの細胞から分離し、そしてそのアミドを、鹼化させて相応の酸にするか、又はアルカリ金属水酸化物もしくはアルカリ土類金属水酸化物を添加しつつ転化させて、相応の酸の塩にする方法である。MHA - アミドを水酸化カルシウムで鹼化させ、そして相応のカルシウム塩を単離することが好ましい。

【0080】

実施例

実施例 1

50

培養条件

前培養は、24時間以内で、30 で振盪下に、容量5mlでガラス試験管中で増殖を行った。1mlの前培養を、100mlの主培養に接種し、そして25 で42時間、全容量1000mlを有するエルレンマイヤーフラスコ中で振盪した。

【0081】

【表1】

前培養用の培地	(pH 7.0)
K ₂ HPO ₄	7 g
KH ₂ PO ₄	3 g
クエン酸 Na	0.5 g
グリセリン	2 g
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	0.004 g
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0.1 g
アセトアミド	2 g
微量の塩溶液	0.1 ml
脱塩水	1000 ml とする

10

20

主培養用の培地	(pH 7.0)
K ₂ HPO ₄	7 g
KH ₂ PO ₄	3 g
クエン酸ナトリウム	0.5 g
グリセリン	2 g
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	0.004 g

30

【0082】

40

【表 2】

MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0.1 g
アセトアミド	10 g
微量塩溶液	0.1 ml
脱塩水	1000 ml とする

10

微量塩溶液	
EDTA, Na ₂ * 2 H ₂ O	158 mg
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	4.7 mg
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	70 mg
MnSO ₄ * 4 H ₂ O	18 mg
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	16 mg
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	4.7 mg
CoSO ₄ * 6 H ₂ O	5.2 mg
脱塩水	1000 ml とする

20

30

【0083】

実施例 2

微生物の単離及び同定

両者の菌株 MA 3 2 と MA 1 1 3 とを、休止細胞のニトリルヒドラターゼ活性を 2 m M のシアン化カリウムの存在下で測定することによって選択した。

【0084】

40

【表 3】

MA32の特性：

細胞形状	桿状	
幅	0.6 - 0.8 μm	
長さ	1.5 - 3.0 μm	
可動性	+	
鞭毛	極性 > 1	
グラム反応	-	10
3% KOH による溶解	+	
アミノペプチダーゼ (Cerny)	+	
オキシダーゼ	+	
カタラーゼ	+	
41°C で増殖	-	
基質利用		
アジピン酸塩	-	
クエン酸塩	+	
リンゴ酸塩	+	20
フェニル酢酸塩	-	
D-グルコース	+	
マルトース	-	
マンニトール	+	
アラビノース	+	
マンノース	+	
トレハロース	+	
ソルビトール	+	
エリスロール	+	
シトラコン酸塩	+	
イノシトール	+	30
ADH	+	
ウレアーゼ	-	
ゼラチンの加水分解	+	
エスクリンの加水分解	+	
サッカロースからのレバン	+	
脱窒	+	40
レシチナーゼ	+	
フルオレセンス	+	
ピオシアニン	-	

【0085】

その細胞性脂肪酸のプロフィールは、シュードモナスの I 群に典型的である。

【0086】

484塩基対長の16S rRNA断片の解析によって、シュードモナス・マルギナリスの配列との100%の一致が結果として得られた。

【 0 0 8 7 】

全てのデータを考慮に入れて、MA32は、シュードモナス・マルギナリスとして同定できた。

【 0 0 8 8 】

【 表 4 】

MA113の特性：

細胞形状	桿状	
幅	0.6 - 0.8 μm	
長さ	1.5 - 3.0 μm	10
可動性	+	
鞭毛	極性 > 1	
グラム反応	-	
3% KOH による溶解	+	
アミノペプチダーゼ (Cerny)	+	
オキシダーゼ	+	
カタラーゼ	+	
41°C で増殖	-	20
基質利用		
アジピン酸塩	-	
クエン酸塩	+	
リンゴ酸塩	+	
フェニル酢酸塩	+	
D-グルコース	+	
マルトース	-	
マンニトール	-	
アラビノース	-	
マンノース	-	
トレハロース	-	
イノシトール	-	30
β -アラニン	+	
α -ケトグルタル酸塩	+	
ベンジルアミン	+	
馬尿酸塩	+	
アゼライン酸塩	+	
D-マンデル酸塩	+	
ADH	+	
ウレアーゼ	-	
ゼラチンの加水分解	-	40
エスクリンの加水分解	-	
サッカロースからのレバン	-	
脱窒	-	
レシチナーゼ	-	
フルオレセンス	+	
ピオシアニン	-	50

【0089】

その細胞性脂肪酸のプロフィールは、シュードモナスのI群に典型的である。

【0090】

476塩基対長の16S rRNA断片の解析によって、シュードモナス・プチダの配列との100%の一致が結果として得られた。

【0091】

全てのデータを考慮に入れて、MA113は、シュードモナス・プチダとして同定できた。

【0092】

実施例3

酵素活性の測定

細胞を、実施例1に記載されるように増殖させ、遠心分離により培養培地から分離し、そして標準的バッファー(50mMのリン酸カリウムバッファー pH7.5)中に再懸濁した。この細胞懸濁液50 μ lを、標準的バッファー700 μ lに添加し、そして反応の開始のために、ニトリルを標準的バッファー中に溶かした200mM溶液250 μ lと混合した。この場合に、細胞懸濁液中の細胞の濃度は、ニトリルが20で10分後に、5~30%まで転化されるように見積もられた。20で10分後に、半分に濃縮されたリン酸20 μ lを添加することによって反応を停止させ、そして細胞を遠心分離によって分離した。

【0093】

【表5】

HPLC-分析	
カラム	Intersil ODS-3V (GL Sciences Inc.)
移動相	10mMのリン酸カリウムバッファー (pH2.3) とアセトニトリルとの混合物 メチオニンニトリルとMHA-ニトリルとアセトンシアンヒドリンについては 85:15の比率 全ての他の基質については99:1の比率
流速	1 ml/分
検出	200nmのUV

【0094】

1ユニットの活性を、1マイクロモルのメタクリルニトリルが1分間転化してアミドとなる酵素量として定義した。アミドの他に酸も生じたのであれば、1ユニットを、1マイクロモルのメタクリルニトリルが1分間転化してアミドと酸となる酵素量として定義した。

【0095】

図1と図2において、菌株MA32と菌株MA113の相対活性を示している。

【0096】

実施例4

ニトリルヒドラターゼの活性へのシアン化合物の影響

実施例3と同様にして製造された細胞懸濁液50 μ lを、0mM、21.4mM、53.6mM及び107.1mMのシアン化カリウムを含有する標準的バッファー700 μ l(最終濃度0mM、20mM、50mM、100mMのシアン化合物)に添加した。反応の開始のために、それぞれ他の反応溶液と同じシアン化合物濃度を有する標準的バッファー中にニトリルを溶かした200mMの溶液200 μ lを添加した。この場合に、細胞懸濁液中の細胞の濃度は、ニトリルが、シアン化合物を含まないバッチ中で20で10

10

20

30

40

50

分後に、16%まで転化されるように見積もられた。20 で10分後に、半分に濃縮されたリン酸20 μ lを添加することによって反応を停止させ、そして転化率を実施例2と同様にして測定した。

【0097】

図3と図4において、シアン化合物濃度に依存するメタクリルニトリルの転化についての相対活性を示している。

【0098】

実施例5

シュドモナス・マルギナリスMA32休止細胞によるアセトンシアンヒドリンの転化
シュドモナス・マルギナリスMA32細胞を、実施例1に記載されるように増殖させ、そして遠心分離した。1.16gの生体乾燥質量を含む細胞の量を、リン酸カリウムバッファ（pH8.0）50mMで最終容量50mlにまで希釈した。更に、該反応混合物に0.02mMの2-メチル-1-プロパンボロン酸を添加した。蒸留したばかりのアセトンシアンヒドリンを、4 で、激しく攪拌しながら連続的に、反応中の濃度がどの時点でも5g/Lを上回らないような速度で添加した。pHは、7.5で一定に保持した。反応の追跡は、HPLCを用いて、実施例3に記載されるようにして実施した。140分後に、10.0gのニトリルは、完全に、10.7gのアミドと1.4gの酸とに転化した。

10

【0099】

図5において、菌株MA113で達成された反応の時間的経過を示している。

20

【0100】

実施例6

シュドモナス・マルギナリスMA32休止細胞による粗製MHA-ニトリルの転化
シュドモナス・マルギナリスMA32細胞を、実施例1に記載されるように増殖させ、そして遠心分離した。0.34gの生体乾燥質量を含む細胞の量を、50mMのリン酸カリウムバッファ（pH8.0）で最終容量70mlにまで希釈した。更に、該反応混合物に0.02mMの2-メチル-1-プロパンボロン酸を添加した。粗製MHA-ニトリルを、4 で、激しく攪拌しながら連続的に、反応中の濃度がどの時点でも10g/Lを上回らないような速度で添加した。pHは、8.0で一定に保持した。反応の追跡は、HPLCを用いて、実施例2に記載されるようにして実施した。510分後に、10.05gのニトリルは、完全に、11.13gのアミドと0.31gの酸とに転化した。それは、1リットルあたり139gのアミドの最終濃度に相当する。

30

【0101】

そのMHA-ニトリルは、3-メチルチオプロピオンアルデヒドと多少過剰な青酸とから直接的に製造された。このMHA-ニトリルを水中に溶かした50mMの溶液は、0.5mMのシアン化合物を含有した（Spektrouquant（登録商標）、メルク社）。

【0102】

図6において、菌株MA32で達成された反応の時間的経過を示している。

【0103】

実施例7

シュドモナス・マルギナリスMA32からのニトリルヒドラターゼ遺伝子クラスターのクローニング及び発現ベクターの構築

-サブユニットと、 -サブユニットと、ニトリルヒドラターゼの活性に同時発現が必須であるニトリルヒドラターゼ-アクチベータータンパク質とを含むニトリルヒドラターゼの遺伝子クラスター（Nojiri et al., 1999, Journal of Biochemistry, 125:696-704）を、プライマー1Fとプライマー1RでPCRによって増幅させて、制限酵素Nde I及びHindIIIのための切断部位を挿入した。こうして得られたPCR産物を、Nde IとHindIIIで切断されたベクター中にライゲーションし、その際、挿入された遺伝子は、ラムノース-プロモーターの制御下にある。こうして得られた発現ベクター

40

50

【表 8】

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Degussa AG
Projekthaus Biotechnologie
Rodenbacher Chaussee
63457 Hanau

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

10

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugewiesenes Bezugszeichen: JML09 (deltarhaB)	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugewiesene EINGANGSNUMMER: DSM 14459
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde <input type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung <input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung eingereicht (Zu verifizieren ankreuzen).	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I. bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2001-08-22 (Datum der Erstinbringung) ¹ eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I. bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Erstinbringung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Erstinbringung in eine Hinterlegung gemäß Budapestischer Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ernstehigten Bediensteten: <i>V. Warko</i> Datum: 2001-08-24

20

30

40

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d) zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

【表 9】

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Degussa AG
Projekthaus Biotechnologie
Rodenbacher Chaussee
63457 Hanau

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHENIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

10

I. HINTERLEGER	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS
Name: Degussa AG Projekthaus Biotechnologie Anschrift: Rodenbacher Chaussee 63457 Hanau	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeleitete ERGANGSNUMMER: DSM 14459 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung: 2001-08-22
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHENIGUNG	
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 2001-08-22 ¹ geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus <input checked="" type="checkbox"/> lebensfähig <input type="checkbox"/> nicht mehr lebensfähig	
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHFÜHRT WORDEN IST ²	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (ihr) von ihr ermächtigten Bediensteten: <i>V. Wals</i> Datum: 2001-08-24

20

30

¹ Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.
² In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer i und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.
³ Zutreffendes ankreuzen.
⁴ Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren

40

【表 1 0】

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROOR-
GANYMEN FÜR DIE ZWECHE VON PATENTVERFAHREN



INTERNATIONALES FORMBLATT

Degussa AG
Service Center Biokatalyse
Rodenbacher Chaussee 4
63457 Hanau

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

10

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: MA32	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 16275
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
Mit dem unter I bezeichneten Mikroorganismus wurde <input type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung <input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2004-03-04 (Datum der Erst- hinterlegung) ¹ eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am _____ eingegangen (Datum der Erst- hinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am _____ eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten: <i>V. Werls</i> Datum: 2004-03-09

20

30

40

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der ³² aus einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

【 0 1 2 1 】

【表 1 1】

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
... ERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN



INTERNATIONALES FORMBLATT

Degussa AG
Service Center Biokatalyse
Rodenbacher Chaussee 4
63457 Hanau

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

10

I HINTERLEGER		II KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Name:	Degussa AG Service Center Biokatalyse	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugewiesene EINGANGSNUMMER:	
Anschrift:	Rodenbacher Chaussee 4 63457 Hanau	DSM 16275	
		Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung ¹ :	
		2004-03-04	
III LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG			
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 2004-03-08 ² geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus			
<input checked="" type="checkbox"/> lebensfähig <input type="checkbox"/> nicht mehr lebensfähig			
IV BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHFÜHRT WORDEN IST³			
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE			
Name:	DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:	
Anschrift:	Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	<i>V. Weiko</i>	
		Datum: 2004-03-09	

20

30

¹ Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.
² In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.
³ Zutreffendes ankreuzen.
⁴ Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

40

【 0 1 2 2 】

【表 1 2】

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN



INTERNATIONALES FORMBLATT

Degussa AG
Service Center Biokatalyse
Rodenbacher Chaussee 4
63457 Hanau

EMPFANGSESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

10

I KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: MA113	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 16276
II WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
Mit dem unter I bezeichneten Mikroorganismus wurde <input type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung <input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).	
III EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2004-03-04 (Datum der Erst- hinterlegung) ¹ eingegangen ist.	
IV EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser internationalen Hinterlegungsstelle am _____ eingegangen (Datum der Erst- hinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am _____ eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten: <i>V. Wehs</i> Datum: 2004-03-09

20

30

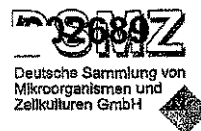
40

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist

【 0 1 2 3 】

【表 1 3】

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN



INTERNATIONALES FORMBLATT

Degussa AG
Service Center Biokatalyse
Rodenbacher Chaussee 4
63457 Hanau

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

10

I. HINTERLEGER		II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Name:	Degussa AG Service Center Biokatalyse Rodenbacher Chaussee 4 63457 Hanau	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugewiesene EINGANGSNUMMER: DSM 16276 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung: 2004-03-04	
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG			
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 2004-03-08 ² geprüft worden Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus <input checked="" type="checkbox"/> lebensfähig <input type="checkbox"/> nicht mehr lebensfähig			
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST¹			
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE			
Name:	DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten: <i>V. Weiler</i> Datum: 2004-03-09	
Anschrift:	Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig		

20

30

¹ Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.
² In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.
³ Zutreffendes ankreuzen.
⁴ Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

40

【 0 1 2 4 】

【表 1 4】

0-1	Formular PCT/RO/134 (SAFE) Angaben zu einem hinterlegten Mikroorganismus und/oder anderem hinterlegten biologischen Material	
0-1-1	erstellt mit	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.169)
0-2	Internationales Aktenzeichen	
0-3	Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	040061 BT
1	Die nachstehenden Angaben betreffen den Mikroorganismus und/ oder anderes biologisches Material, der/das in der Beschreibung genannt ist	
1-1	Seite	30-31
1-2	Zeile	-
1-3	Angaben betr. Hinterlegung	
1-3-1	Name der Hinterlegungsstelle	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroor- ganismen und Zellkulturen GmbH
1-3-2	Anschrift der Hinterlegungsstelle	Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany
1-3-3	Datum der Hinterlegung	22. August 2001 (22.08.2001)
1-3-4	Eingangsnummer	DSMZ 14459
1-5	Bestimmungsstaaten, für die besondere Angaben gemacht werden	alle Bestimmungsstaaten
2	Die nachstehenden Angaben betreffen den Mikroorganismus und/ oder anderes biologisches Material, der/das in der Beschreibung genannt ist	
2-1	Seite	32-33
2-2	Zeile	-
2-3	Angaben betr. Hinterlegung	
2-3-1	Name der Hinterlegungsstelle	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroor- ganismen und Zellkulturen GmbH
2-3-2	Anschrift der Hinterlegungsstelle	Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany
2-3-3	Datum der Hinterlegung	04. März 2004 (04.03.2004)
2-3-4	Eingangsnummer	DSMZ 16275
2-5	Bestimmungsstaaten, für die besondere Angaben gemacht werden	alle Bestimmungsstaaten

10

20

30

【 0 1 2 5 】

【表 1 5】

3	Die nachstehenden Angaben betreffen den Mikroorganismus und/oder anderes biologisches Material, der/das in der Beschreibung genannt ist	
3-1	Seite	34-35
3-2	Zeile	..
3-3	Angaben betr. Hinterlegung	
3-3-1	Name der Hinterlegungsstelle	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
3-3-2	Anschrift der Hinterlegungsstelle	Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany
3-3-3	Datum der Hinterlegung	04. März 2004 (04.03.2004)
3-3-4	Eingangsnummer	DSMZ 16276
3-5	Bestimmungsstaaten, für die besondere Angaben gemacht werden	alle Bestimmungsstaaten

VOM ANMELDEAMT AUSZUFÜLLEN

0-4	Dieses Formular ist mit der Internationalen Anmeldung eingegangen (Ja oder nein)	Ja
0-4-1	Bevollmächtigter Bediensteter	Y. Marinus-v.d. Neuweland

VOM INTERNATIONALEN BÜRO AUSZUFÜLLEN

0-5	Dieses Formular ist an folgendem Datum beim Internationalen Büro eingegangen	
0-5-1	Bevollmächtigter Bediensteter	

【図面の簡単な説明】

【 0 1 2 6 】

【図 1】図 1 は、菌株 M A 3 2 の相対活性を示している

【図 2】図 2 は、菌株 M A 1 1 3 の相対活性を示している

【図 3】図 3 は、菌株 M A 3 1 でのシアン化合物濃度に依存するメタクリルニトリルの転化についての相対活性を示している

【図 4】図 4 は、菌株 M A 1 1 3 でのシアン化合物濃度に依存するメタクリルニトリルの転化についての相対活性を示している

【図 5】図 5 は、菌株 M A 1 1 3 で達成された反応の時間的経過を示している

【図 6】図 6 は、菌株 M A 3 2 で達成された反応の時間的経過を示している

【図 7】図 7 は、プラスミド p K E 3 1 の制限地図を示している

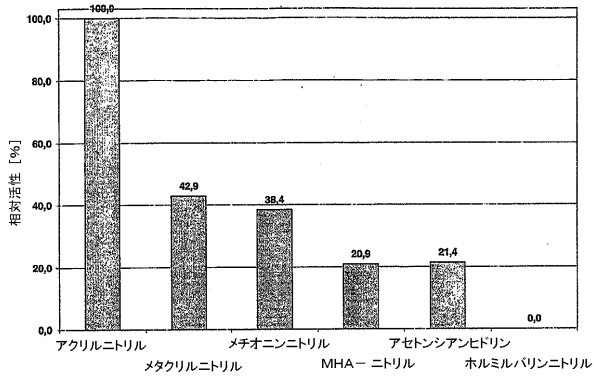
10

20

30

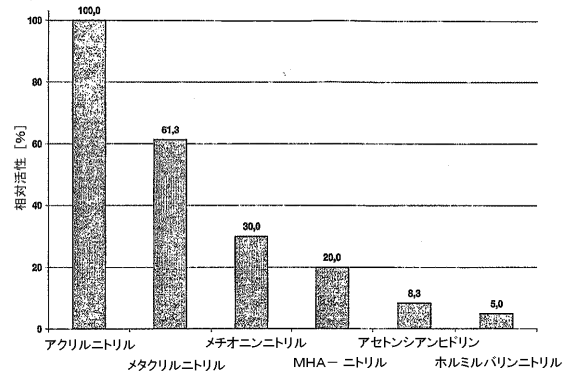
【 図 1 】

MA32



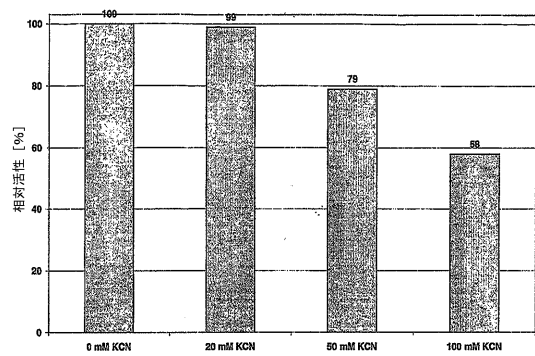
【 図 2 】

MA113



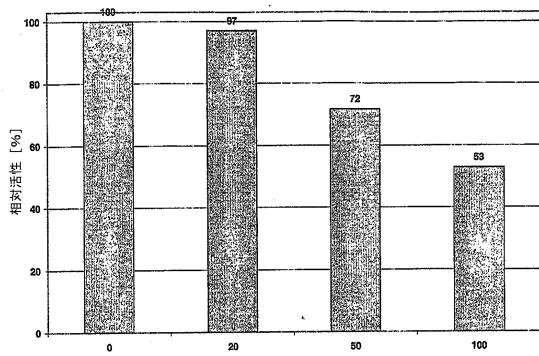
【 図 3 】

MA31



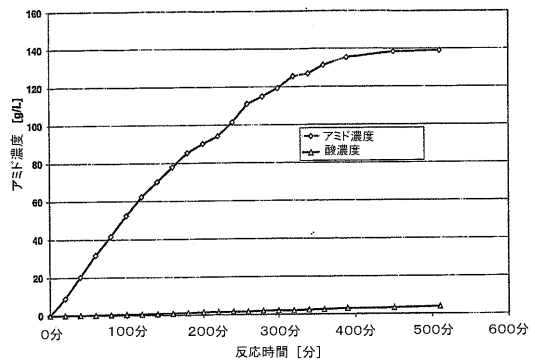
【 図 4 】

MA113



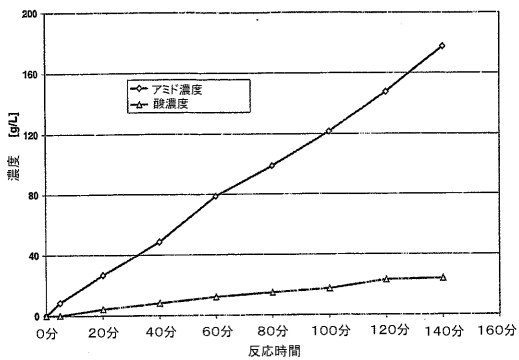
【 図 6 】

MA32

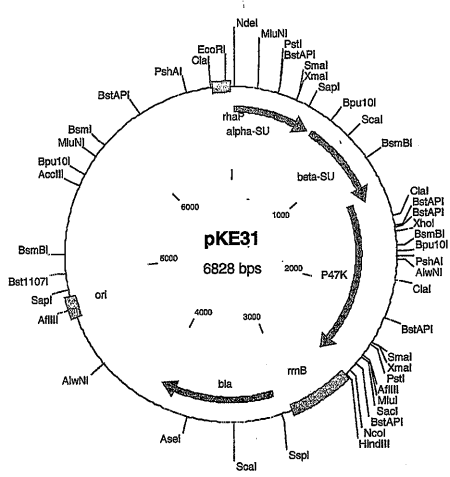


【 図 5 】

MA113



【 図 7 】



【 配列表 】

2007537726000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/002689

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/21 C12P13/02		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K C12P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 789 211 A (YAMADA ET AL) 4 August 1998 (1998-08-04) the whole document	1-28
X	WO 98/37204 A (WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION) 27 August 1998 (1998-08-27) the whole document	1-28
X	EP 1 266 962 A (DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES, LTD) 18 December 2002 (2002-12-18) the whole document	1-28
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 June 2005		Date of mailing of the international search report 13. 10. 2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Novak-Giese, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/EP2005/002689

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BRADY D ET AL: "Characterisation of nitrilase and nitrile hydratase biocatalytic systems." APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY. MAR 2004, vol. 64, no. 1, March 2004 (2004-03), pages 76-85, XP002333496 ISSN: 0175-7598 the whole document	1-28
Y	NOJIRI M ET AL: "Functional expression of nitrile hydratase in Escherichia coli: requirement of a nitrile hydratase activator and post-translational modification of a ligand cysteine." JOURNAL OF BIOCHEMISTRY. APR 1999, vol. 125, no. 4, April 1999 (1999-04), pages 696-704, XP002333497 ISSN: 0021-924X the whole document	1-28
P,X	WO 2004/067738 A (DEGUSSA AG; SYLDATK, CHRISTOPH; BRANDAO, PEDRO; BULL, ALAN, T; VERSECK) 12 August 2004 (2004-08-12) the whole document	1-28
P,X	WO 2004/111227 A (DEGUSSA AG; MAY, OLIVER; DRAUZ, KARLHEINZ; BUCHHOLZ, STEFAN) 23 December 2004 (2004-12-23) the whole document	1-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2005/002689

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-28 (in part)

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2005/002689

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, namely

1. Claims 1-28 (in part)

polypeptides or polynucleotides that are coded by Seq. Id. No. 1, 2 and 3, and methods of using them.

2. Claims 1-28 (in part)

polypeptides or polynucleotides that are coded by Seq. Id. No. 6, 7 and 8, and methods of using them.

3. Claims 1-28 (in part)

polypeptides or polynucleotides that are coded by Seq. Id. No. 4 and 5, and methods of using them.

4. Claims 1-28 (in part)

polypeptides or polynucleotides that are coded by Seq. Id. No. 9 and 10, and methods of using them.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/EP2005/002689

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5789211	A	04-08-1998	NONE
WO 9837204	A	27-08-1998	AU 6331998 A 09-09-1998 CA 2281001 A1 27-08-1998 EP 0972049 A1 19-01-2000 US 6303352 B1 16-10-2001 US 6087140 A 11-07-2000
EP 1266962	A	18-12-2002	JP 2002369697 A 24-12-2002 US 2003124691 A1 03-07-2003
WO 2004067738	A	12-08-2004	NONE
WO 2004111227	A	23-12-2004	NONE

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/002689

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C07K14/21 C12P13/02		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C07K C12P		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 789 211 A (YAMADA ET AL) 4. August 1998 (1998-08-04) das ganze Dokument -----	1-28
X	WO 98/37204 A (WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION) 27. August 1998 (1998-08-27) das ganze Dokument -----	1-28
X	EP 1 266 962 A (DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES, LTD) 18. Dezember 2002 (2002-12-18) das ganze Dokument -----	1-28
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
^o Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 28. Juni 2005		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 13. 10. 2005
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5018 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Novak-Giese, S

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

 Internationales Aktenzeichen
 PCT/EP2005/002689

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	BRADY D ET AL: "Characterisation of nitrilase and nitrile hydratase biocatalytic systems." APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY. MAR 2004, Bd. 64, Nr. 1, März 2004 (2004-03), Seiten 76-85, XP002333496 ISSN: 0175-7598 das ganze Dokument -----	1-28
Y	NOJIRI M ET AL: "Functional expression of nitrile hydratase in Escherichia coli: requirement of a nitrile hydratase activator and post-translational modification of a ligand cysteine." JOURNAL OF BIOCHEMISTRY. APR 1999, Bd. 125, Nr. 4, April 1999 (1999-04), Seiten 696-704, XP002333497 ISSN: 0021-924X das ganze Dokument -----	1-28
P,X	WO 2004/067738 A (DEGUSSA AG; SYLDATK, CHRISTOPH; BRANDAO, PEDRO; BULL, ALAN, T; VERSECK) 12. August 2004 (2004-08-12) das ganze Dokument -----	1-28
P,X	WO 2004/111227 A (DEGUSSA AG; MAY, OLIVER; DRAUZ, KARLHEINZ; BUCHHOLZ, STEFAN) 23. Dezember 2004 (2004-12-23) das ganze Dokument -----	1-28

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2005/002689

Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. _____ weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich _____
2. Ansprüche Nr. _____ weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich _____
3. Ansprüche Nr. _____ weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
1-28 (teilweise)

- Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs**
- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Internationales Aktenzeichen PCT/ EP2005/ 002689

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-28 (teilweise)

Polypeptide bzw. Polynukleotide die von SEQ ID Nos 1,2 und 3 kodiert werden, bzw. Verfahren diese zu benutzen.

2. Ansprüche: 1-28 (teilweise)

Polypeptide bzw. Polynukleotide die von SEQ ID Nos 6,7 und 8 kodiert werden, bzw. Verfahren diese zu benutzen.

3. Ansprüche: 1-28 (teilweise)

Polypeptide bzw. Polynukleotide die von SEQ ID Nos 4 und 5 kodiert werden, bzw. Verfahren diese zu benutzen.

4. Ansprüche: 1-28 (teilweise)

Polypeptide bzw. Polynukleotide die von SEQ ID Nos 9 und 10 kodiert werden, bzw. Verfahren diese zu benutzen.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/002689

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5789211	A	04-08-1998	KEINE
WO 9837204	A	27-08-1998	AU 6331998 A 09-09-1998 CA 2281001 A1 27-08-1998 EP 0972049 A1 19-01-2000 US 6303352 B1 16-10-2001 US 6087140 A 11-07-2000
EP 1266962	A	18-12-2002	JP 2002369697 A 24-12-2002 US 2003124691 A1 03-07-2003
WO 2004067738	A	12-08-2004	KEINE
WO 2004111227	A	23-12-2004	KEINE

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/00 A
C 1 2 P 13/02 (2006.01) C 1 2 P 13/02

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100110593

弁理士 杉本 博司

(74) 代理人 100114890

弁理士 アインゼル・フェリックス＝ラインハルト

(74) 代理人 230100044

弁護士 ラインハルト・アインゼル

(72) 発明者 シュテフェン オスヴァルト

ドイツ連邦共和国 ローデンバッハ ラントヴェアーシュトラッセ 3 3

(72) 発明者 クリストフ ヴェックベッカー

ドイツ連邦共和国 グリュンダウ - リープロース アウグスト - イムホーフ - シュトラッセ 2 5

(72) 発明者 クラウス フートマッハー

ドイツ連邦共和国 ゲルンハウゼン レルヒェンヴェーク 1 8

(72) 発明者 タチャーナ グラシモワ

ロシア国 モスクワ ボドルスキー クルサントフ 1 8 / 1 カーベール 6 2 6

(72) 発明者 アンドレ ノピコフ

ロシア国 モスクワ クランスノプレスネンスカヤ ナーベレジナヤ 1 / 2 カーベール 1 0 7

(72) 発明者 ルドミラ リャブチェンコ

ロシア国 オディントコヴォ モスクワ レジョン モツァイスコエ ショッセ 1 1 3

(72) 発明者 アレクサンダー ヤニェンコ

ロシア国 モスクワ クツォーフスキー プラスペクト 3 3 カーベール 1 3 5

(72) 発明者 クセニア エゴロワ

ドイツ連邦共和国 ハンブルク ベーレントールヴェーク 1 1 9

F ターム(参考) 4B024 AA03 BA07 BA80 CA04 DA09 EA04 GA11 HA03

4B050 CC01 CC03 DD02 LL05

4B064 AE02 CA02 CA19 CA21 CC24 CD12 DA16

4B065 AA41X AA41Y AA44X AA44Y AB01 AC14 BA02 CA16 CA27