(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년01월10일
(11) 등록번호 10-0794001
(24) 등록일자 2008년01월04일

(51) Int. Cl.
C12N 9/78 (2006.01) *C12N 9/88* (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-7015994(분할)
(22) 출원일자 2007년07월12일
심사청구일자 2007년07월12일
번역문제출일자 2007년07월12일
(65) 공개번호 10-2007-0087054
(43) 공개일자 2007년08월27일
(62) 원출원 특허 10-2005-7011335
원출원일자 2005년06월17일
심사청구일자 2005년06월20일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2003/016014
국제출원일자 2003년12월15일
(87) 국제공개번호 WO 2004/056990
국제공개일자 2004년07월08일
(30) 우선권주장
JP-P-2002-00368360 2002년12월19일 일본(JP)
JP-P-2003-00379280 2003년11월10일 일본(JP)
(56) 선행기술조사문헌
JP 9-275978 A
전체 청구항 수 : 총 13 항

(73) 특허권자
미쓰이 가가쿠 가부시키가이샤
일본국 도쿄도 미나토쿠 히가시심바시 1-5-2
(72) 발명자
야마키 토시후미
일본국 치바켄 모바라시 토고 1144 미쓰이가가쿠 가부시키가이샤나이
반바 신이치
일본국 치바켄 모바라시 토고 1144 미쓰이가가쿠 가부시키가이샤나이
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 원전

심사관 : 조영균

(54) 신규의 니트릴히드라타제

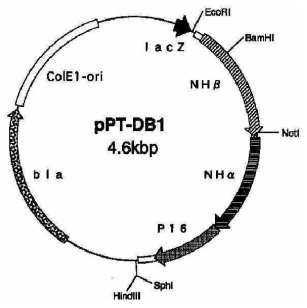
(57) 요 약

본 발명은 신규한 변이점을 가지는 니트릴히드라타제의 아미노산 서열 및 상기 유전자의 염기 서열을 제공하는 것을 과제로 하고, 또한 니트릴히드라타제 활성을 가지는 효소의 개변 방법을 제공하는 것도 과제로 하고 있다.

상기 과제를 해결하는 수단으로서 슈도노카르디아 서모필라(*Pseudonocardia thermophila*) JCM3095 유래이며, 이질인 2종의 서브유닛으로 구성되는 니트릴히드라타제에 신규한 변이를 도입하여, 얻어지는 변이체의 아미노산 서열 및 상기 유전자의 염기 서열을 제공한다. 또한, 개변 대상이 되는 영역을 니트릴히드라타제 중의 입체 구조/아미노산 서열 중에 특정하여, 상기 영역을 형성하는 아미노산 잔기에 상당하는 아미노산 서열 중의 아미노산에 치환·삽입·삭제 등의 변경을 가함으로써 니트릴히드라타제를 개변한다.

본 발명에 의해, 니트릴 화합물을 대응하는 아미드 화합물로, 종래 기술에 비해 효율 좋게 변환하는 것이 가능해진다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

마토이시 카오리

일본국 치바켄 모바라시 토고 1144 미쓰이가가쿠가부시키가이샤나이

이토 키요시

일본국 치바켄 소데가우라시 나가우라 580-32 미쓰이가가쿠가부시키가이샤 나이

고바야시 히데키

일본국 치바켄 모바라시 토고 1144 미쓰이가가쿠가부시키가이샤나이

타나카 에이시

일본국 치바켄 소데가우라시 나가우라 580-32 미쓰이가가쿠가부시키가이샤 나이

오이카와 토시히로

일본국 치바켄 모바라시 토고 1144 미쓰이가가쿠가부시키가이샤나이

특허청구의 범위

청구항 1

α-서브유닛과 β-서브유닛을 가지는 니트릴히드라타제에 있어서,

상기 α-서브유닛의 서열목록의 서열번호: 1의 아미노산 서열의 6번째, 19번째 및 126번째의 아미노산이 각각 Thr, Val 및 Tyr로 치환되고, 상기 β-서브유닛의 서열목록의 서열번호: 2의 아미노산 서열의 46번째, 108번째 및 212번째의 아미노산이 각각 Lys, Arg 및 Tyr로 치환된 아미노산 서열을 갖거나, 또는,

상기 α-서브유닛의 서열목록의 서열번호: 1의 아미노산 서열의 6번째, 19번째 및 126번째의 아미노산이 각각 Thr, Val 및 Tyr로 치환되고, 상기 β-서브유닛의 서열목록의 서열번호: 2의 아미노산 서열의 48번째, 108번째 및 212번째의 아미노산이 각각 Val, Arg 및 Tyr로 치환된 아미노산 서열을 갖거나, 또는,

상기 α-서브유닛의 서열목록의 서열번호: 1의 아미노산 서열의 6번째, 19번째 및 126번째의 아미노산이 각각 Ala, Val 및 Tyr로 치환되고, 상기 β-서브유닛의 서열목록의 서열번호: 2의 아미노산 서열의 127번째, 160번째 및 186번째의 아미노산이 각각 Ser, Trp 및 Arg로 치환된 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 니트릴히드라타제.

청구항 2

니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자와 β-서브유닛의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자를 가지는 니트릴히드라타제를 코딩하는 유전자에 있어서,

상기 α-서브유닛의 서열목록의 서열번호: 1의 아미노산 서열의 6번째, 19번째 및 126번째의 아미노산이 각각 Thr, Val 및 Tyr로 치환되고, 상기 β-서브유닛의 서열목록의 서열번호: 2의 아미노산 서열의 46번째, 108번째 및 212번째의 아미노산이 각각 Lys, Arg 및 Tyr로 치환된 아미노산 서열, 또는,

상기 α-서브유닛의 서열목록의 서열번호: 1의 아미노산 서열의 6번째, 19번째 및 126번째의 아미노산이 각각 Thr, Val 및 Tyr로 치환되고, 상기 β-서브유닛의 서열목록의 서열번호: 2의 아미노산 서열의 48번째, 108번째 및 212번째의 아미노산이 각각 Val, Arg 및 Tyr로 치환된 아미노산 서열, 또는,

상기 α-서브유닛의 서열목록의 서열번호: 1의 아미노산 서열의 6번째, 19번째 및 126번째의 아미노산이 각각 Ala, Val 및 Tyr로 치환되고, 상기 β-서브유닛의 서열목록의 서열번호: 2의 아미노산 서열의 127번째, 160번째 및 186번째의 아미노산이 각각 Ser, Trp 및 Arg로 치환된 아미노산 서열을 코딩하는 것을 특징으로 하는 유전자.

청구항 3

니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자와 β-서브유닛의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자를 가지는 니트릴히드라타제를 코딩하는 유전자에 있어서,

상기 α-서브유닛의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자가, 서열목록의 서열번호: 3의 염기서열의 16번째 내지 18번째 및 55번째 내지 57번째 및 376번째 내지 378번째가 각각 ACG, GTG 및 TAC로 치환하여 얻어지는 염기 서열을 갖고, 상기 β-서브유닛의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자가, 서열목록의 서열번호: 4의 염기서열의 136번째 내지 138번째 및 322번째 내지 324번째 및 634번째 내지 636번째가 각각 AAG, CGC 및 TAC로 치환하여 얻어지는 염기 서열을 갖거나, 또는

상기 α-서브유닛의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자가, 서열목록의 서열번호: 3의 염기서열의 16번째 내지 18번째 및 55번째 내지 57번째 및 376번째 내지 378번째가 각각 ACG, GTG 및 TAC로 치환하여 얻어지는 염기 서열을 갖고, 상기 β-서브유닛의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자가, 서열목록의 서열번호: 4의 염기서열의 142번째 내지 144번째 및 322번째 내지 324번째 및 634번째 내지 636번째가 각각 GTG, CGG 및 TAC로 치환하여 얻어지는 염기 서열을 갖거나, 또는

상기 α-서브유닛의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자가, 서열목록의 서열번호: 3의 염기서열의 16번째 내지 18번째 및 55번째 내지 57번째 및 376번째 내지 378번째가 각각 GCG, GTG 및 TAC로 치환하여 얻어지는 염기 서열을 갖고, 상기 β-서브유닛의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자가, 서열목록의 서열번호: 4의 염기서열의 379번째 내지 381번째, 478번째 내지 480번째 및 556번째 내지 558번째가 각각 TCG, TGG 및 CGG로 치환하여 얻어지는

염기 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 유전자.

청구항 4

니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자와 β-서브유닛의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자를 가지는 니트릴히드라타제를 코딩하는 유전자에 있어서,

상기 α-서브유닛의 서열목록의 서열번호: 1의 아미노산 서열의 6번째, 36번째 및 126번째의 아미노산이 각각 Thr, Met 및 Tyr로 치환되고, 상기 β-서브유닛의 서열목록의 서열번호: 2의 아미노산 서열의 10번째, 118번째 및 200번째의 아미노산이 각각 Asp, Val 및 Glu로 치환된 아미노산 서열, 또는

상기 α-서브유닛의 서열목록의 서열번호: 1의 아미노산 서열의 19번째, 71번째 및 126번째의 아미노산이 각각 Val, His 및 Tyr로 치환되고, 상기 β-서브유닛의 서열목록의 서열번호: 2의 아미노산 서열의 37번째, 108번째 및 200번째의 아미노산이 각각 Leu, Asp 및 Glu로 치환된 아미노산 서열, 또는

상기 α-서브유닛의 서열목록의 서열번호: 1의 아미노산 서열의 19번째, 71번째 및 126번째의 아미노산이 각각 Val, His 및 Tyr로 치환되고, 상기 β-서브유닛의 서열목록의 서열번호: 2의 아미노산 서열의 37번째, 108번째 및 200번째의 아미노산이 각각 Val, Asp 및 Glu로 치환된 아미노산 서열, 또는

상기 α-서브유닛의 서열목록의 서열번호: 1의 아미노산 서열의 36번째, 148번째 및 204번째의 아미노산이 각각 Met, Asp 및 Arg로 치환되고, 상기 β-서브유닛의 서열목록의 서열번호: 2의 아미노산 서열의 41번째, 51번째 및 108번째의 아미노산이 각각 Ile, Val 및 Asp로 치환된 아미노산 서열을 코딩하는 것을 특징으로 하는 유전자.

청구항 5

니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자와 β-서브유닛의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자를 가지는 니트릴히드라타제를 코딩하는 유전자에 있어서,

상기 α-서브유닛의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자가, 서열목록의 서열번호: 3의 염기서열의 16번째 내지 18번째 및 106번째 내지 108번째 및 376번째 내지 378번째가 각각 ACG, ATG 및 TAC로 치환하여 얻어지는 염기 서열을 갖고, 상기 β-서브유닛의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자가, 서열목록의 서열번호: 4의 염기서열의 28번째 내지 30번째 및 352번째 내지 354번째 및 598번째 내지 600번째가 각각 GAC, GTC 및 GAC로 치환하여 얻어지는 염기 서열을 갖거나, 또는

상기 α-서브유닛의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자가, 서열목록의 서열번호: 3의 염기서열의 55번째 내지 57번째 및 211번째 내지 213번째 및 376번째 내지 378번째가 각각 GTG, CAT 및 TAC로 치환하여 얻어지는 염기 서열을 갖고, 상기 β-서브유닛의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자가, 서열목록의 서열번호: 4의 염기서열의 109번째 내지 111번째 및 322번째 내지 324번째 및 598번째 내지 600번째가 각각 CTC, GAT 및 GAC로 치환하여 얻어지는 염기 서열을 갖거나, 또는

상기 α-서브유닛의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자가, 서열목록의 서열번호: 3의 염기서열의 55번째 내지 57번째 및 211번째 내지 213번째 및 376번째 내지 378번째가 각각 GTG, CAT 및 TAC로 치환하여 얻어지는 염기 서열을 갖고, 상기 β-서브유닛의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자가, 서열목록의 서열번호: 4의 염기서열의 109번째 내지 111번째 및 322번째 내지 324번째 및 598번째 내지 600번째가 각각 GTC, GAT 및 GAC로 치환하여 얻어지는 염기 서열을 갖거나, 또는

상기 α-서브유닛의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자가, 서열목록의 서열번호: 3의 염기서열의 106번째 내지 108번째 및 442번째 내지 444번째 및 610번째 내지 612번째가 각각 ATG, GAC 및 CGC로 치환하여 얻어지는 염기 서열을 갖고, 상기 β-서브유닛의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자가, 서열목록의 서열번호: 4의 염기서열의 121번째 내지 123번째 및 151번째 내지 153번째 및 322번째 내지 324번째가 각각 ATC, GTC 및 GAT로 치환하여 얻어지는 염기 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 유전자.

청구항 6

니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자와 β-서브유닛의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자를 가지는 니트릴히드라타제를 코딩하는 유전자에 있어서,

상기 α-서브유닛의 서열목록의 서열번호: 1의 아미노산 서열의 148번째 및 204번째의 아미노산이 각각 Asp 및

Arg로 치환되고, 상기 β-서브유닛의 서열목록의 서열번호: 2의 아미노산 서열의 108번째 및 200번째의 아미노산이 각각 Asp 및 Glu로 치환된 아미노산 서열을 코딩하는 것을 특징으로 하는 유전자.

청구항 7

니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자와 β-서브유닛의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자를 가지는 니트릴히드라타제를 코딩하는 유전자에 있어서,

상기 α-서브유닛의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자가, 서열목록의 서열번호: 3의 염기서열의 442번째 내지 444번째 및 610번째 내지 612번째가 각각 GAC 및 CGC로 치환하여 얻어지는 염기 서열을 갖고, 상기 β-서브유닛의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자가, 서열목록의 서열번호: 4의 염기서열의 322번째 내지 324번째 및 598번째 내지 600번째가 각각 GAT 및 GAC로 치환하여 얻어지는 염기 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 유전자.

청구항 8

제 2 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 따른 니트릴히드라타제를 코딩하는 유전자를 갖는 것을 특징으로 하는 플라스미드.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 니트릴히드라타제의 숙주 세포에서의 발현을 위한 구성을 가지는 플라스미드.

청구항 10

제 9 항에 따른 플라스미드에 의해 숙주 세포를 형질전환하여 얻어진 형질전환체.

청구항 11

니트릴히드라타제의 생산 방법에 있어서,

제 10 항에 따른 형질전환체를 배지에서 배양하여, 상기 형질전환체에 상기 플라스미드가 가지는 니트릴히드라타제 유전자에 기초하는 니트릴히드라타제를 생산시키는 공정을 가지는 것을 특징으로 하는 생산 방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 배양 후의 형질전환체, 배양액 및 그것들의 처리물로부터 니트릴히드라타제를 회수하는 공정을 추가로 가지는 생산 방법.

청구항 13

니트릴 화합물을 수성 매체 중에서 니트릴히드라타제와 접촉시켜 대응하는 아미드 화합물을 얻는 아미드 화합물의 제조 방법으로서,

상기 니트릴히드라타제가 제 1 항에 따른 것임을 특징으로 하는 제조 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 신규의 니트릴히드라타제 및 그것을 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 함유하는 플라스미드, 상기 플라스미드에 의해 형질전환된 세포주, 상기 세포주를 이용하여 니트릴히드라타제를 생산하는 방법, 및 상기 세포주를 배양하여 얻어지는 배양액·세포·세포 처리물을 이용하여 니트릴 화합물로부터 대응하는 아미드 화합물을 제조하는 방법에 관한 것이다.

<2> 또한, 본 발명은 니트릴히드라타제 활성을 가지는 효소의 성질을 개변하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 성질이 개변된 효소, 및 그것을 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 함유하는 플라스미드, 상기 플라스미드에 의해 형질전환된 세포주, 상기 세포주를 이용하여 니트릴히드라타제를 생산하는 방법, 및 상기 세포주를 배양하여 얻어지는 배양액·세포·세포 처리물을 이용하여 니트릴 화합물로부터 대응하는 아미드 화합물을 제조하는

방법에 관한 것이다. 본 발명은 생체 촉매를 이용한 물질 생산의 분야에 있어서 유용하다.

배 경 기 술

<3> 각종 화합물의 니트릴기를 수화에 의해 아미드기로 변환하는 니트릴 수화 활성을 가지는 효소인 니트릴히드라타제가 발견되어, 상기 효소를 생산하는 미생물주가 다수 개시되어 있다. 니트릴히드라타제를 이용하여 니트릴 화합물로부터 아미드 화합물을 공업적으로 제조하기 위해서는, 아미드 화합물의 제조 비용을 차지하는 상기 효소의 제조 비용을 감소시키는 것이 중요하다. 구체적으로는, 효소 조제물의 단위 중량당 상기 효소 함유량을 높게 할 필요가 있다. 그래서, 상기 효소의 유전자를 이용하여 유전자 공학의 수법에 의해 상기 효소를 대량으로 발현시키는 것을 목적으로 하여, 상기 효소의 유전자를 클로닝하는 시도가 이루어지고 있다.

<4> 니트릴히드라타제 활성을 가지는 미생물로서는, 로도코커스 로도크로우스(*Rhodococcus rhodochrous*) J-1주(부다페스트 조약에 준거하여, 수탁 번호 FERMbkp-1478로서,, 일본 이바라키현 츠쿠바시 히가시 1쵸메 1방 1고 츠쿠바 센트럴 6의 독립행정법인 산업기술 총합연구소 특허생물기탁센터에 기탁되어 있다.), 및 슈도노카르디아 서모필라(*Pseudonocardia thermophila*; 본 균주는 이화학연구소 미생물계통 보존시설(일본 사이타마현 와코시 히로사와 2-1)에 번호 JCM3095로서 보관되어, 누구에게나 청구에 의해 자유롭게 분양된다. 또한, 부다페스트 조약에 준거하여, 수탁 번호 FERMbkp-7379로서 독립행정법인 산업기술 총합연구소 특허생물기탁센터에 기탁되어 있다.)가 알려져 있다(특허문헌 1 및 3 참조).

<5> 또한, 이들 주로부터 니트릴히드라타제가 단리되어, 상기 효소가 일반적으로 α-서브유닛 및 β-서브유닛으로 불리우는 2종류의 폴리펩티드를 구성요소로 하고 있는 것이 확인되어 있다. 그리고, 이들 주로부터 니트릴히드라타제 유전자가 단리되어, 그것의 아미노산 서열 및 염기 서열이 밝혀졌다. 또한, 이들 니트릴히드라타제를 형질전환체 내에서 발현할 수 있는 플라스미드 및 상기 플라스미드에 의해 형질전환된 세포주(예로서, TG1/pNHJ10H 및 MT-10822: 이것들은 부다페스트 조약에 준거하여, 전자는 수탁 번호 FERMbkp-2777로서 독립행정법인 산업기술 총합연구소 특허생물기탁센터에 기탁되고, 후자는 수탁 번호 FERMbkp-5785로서 일본 이바라키현 츠쿠바시 히가시 1쵸메 1방 1고 츠쿠바 센트럴 6의 독립행정법인 산업기술 총합연구소 특허생물기탁센터에 1996년 2월 7일자로 기탁되어 있다.)가 제작되었다. 게다가, 상기 세포주들에 의한 니트릴히드라타제의 생산 및 상기 세포주 또는 그것으로부터 얻어지는 니트릴히드라타제를 니트릴 화합물과 접촉시킴에 의하여 대응하는 아미드 화합물의 제조가 가능해지고 있다(특허문헌 2 및 4, 비특허문헌 1 참조).

<6> 또한, 니트릴히드라타제의 입체 구조를 해석하는 시도도 이루어져 있으며, 상기 해석 결과는 PDB 번호 1AHJ, 2AHJ, 1IRE 로서 공개되어 있다. 상기 효소는 α-서브유닛과 β-서브유닛이 회합한 2량체가 그 기본 구조 단위로 되어 있고, 상기 2량체는 더욱 회합하여 4량체나 8량체, 12량체(유래가 되는 생물종에 따라 다르다.)를 형성하여, 그 활성을 발휘하는 것으로 밝혀져 있다. 또한, 그 활성 중심으로 형성하는 영역이나 구조도 밝혀져서, 활성 중심은 반응 용매에 직접 접촉하는 효소 외측에 노출된 위치가 아니라, 효소 내부에 끼워 넣어진 것과 같은 위치에 존재하는 것으로 알려져 있다. 활성의 발휘에 필수인 금속 원자(코발트 원자 또는 철 원자: 유래가 되는 생물종에 따라 다르다.)의 활성 중심으로의 배위의 형태도 알려져 있고, 금속 원자의 배위에 수반하는 현상으로서 활성 중심으로 형성하는 영역을 이루는 아미노산 서열 중의 시스테인 잔기가 번역 후 산화를 일으키는 것도 밝혀져 있다. 구체적으로는, α-서브유닛의 아미노산 서열 중의 $X_1CXLC_1SC_2X_2X_3X_4X_5$(C는 시스테인을, X는 세린 또는 트레오닌을, L는 류신을, C_1은 시스테인 술핀산(CYSTEINE SULFINIC ACID・3-SULFINOALANINE)을, S는 세린을, C_2는 시스테인 술펜산(CYSTEINE SULFENIC ACID・S-HYDROXY-CYSTEINE)을, X_1・X_2・X_3・X_4・X_5는 임의의 아미노산을 나타낸다)라는 서열로 표시되는 영역이 활성 중심으로의 금속 원자의 배위를 담당하는 영역으로 되어 있다(비특허문헌 2 내지 4 참조).

<7> 그러나, 니트릴히드라타제 본래의 활성은 손상시키지 않고, 활성・기질 특이성・Vmax・Km・열안정성・기질에 대한 안정성・생성물에 대한 안정성 등의 성질을 개변하는 방법에 관해서는, 구체적인 수법을 개시한 발명은 아직도 이루어져 있지 않다. 특히, 니트릴히드라타제의 입체 구조에 주목하여, 상기 구조를 변화시켜서 상기 성질을 개변하는 방법에 관해서는 그 시도 자체가 이루어져 있지 않다.

<8> 또한, 니트릴히드라타제를 코딩하는 유전자를 숙주 세포에서 발현시켜 효소 활성이 있는 니트릴히드라타제를 생산하는 경우에 상기 효소의 활성화에 관여하는 단백질이 존재한다는 것이 특허문헌 5에 개시되어 있다.

<9> 특허문헌 1: 일본국 특개평2-470호 공보

<10> 특허문헌 2: 일본국 특개평4-211379호 공보

<11> 특허문헌 3: 일본국 특개평8-56684호 공보

<12> 특허문헌 4: 일본국 특개평9-275978호 공보

<13> 특허문헌 5: 일본국 특개평11-253168호 공보

<14> 비특허문헌 1: Kobayashi M, Nishiyama M, Nagasawa T, Horinouchi S, Beppu T, Yamada H. Cloning, nucleotide sequence and expression in Escherichia coli of two cobalt-containing nitrile hydratase genes from Rhodococcus rhodochrous J1. Biochim. Biophys. Acta. 1991 Dec. 2;1129(1): 23-33.

<15> 비특허문헌 2: Huang W, Jia J, Cummings J, Nelson M, Schneider G, Lindqvist Y. Crystal structure of nitrile hydratase reveals a novel iron centre in a novel fold. Structure. 1997 May 15;5(5): 691-9.

<16> 비특허문헌 3: Nagashima S, Nakasako M, Dohmae N, Tsujimura M, Takio K, Odaka M, Yohda M, Kamiya N, Endo I. Novel non-heme iron center of nitrile hydratase with a claw setting of oxygen atoms. Nat. Struct. Biol. 1998 May;5(5): 347-51.

<17> 비특허문헌 4: Miyanaga, A., Fushinobu, S., Ito, K., and Wakagi, T. Crystal structure of cobalt-containing nitrile hydratase. Biochem. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001 Nov. 16;288(5): 1169-74.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<18> 발명의 개시

<19> 본 발명의 목적은 기능을 실질적으로 변화시키지 않는 신규한 치환 변이 부위를 가지는 니트릴히드라타제의 아미노산 서열 및 상기 유전자의 염기 서열을 제공하는 것이다. 게다가, 상기 유전자를 포함하는 플라스미드, 상기 플라스미드에 의해 형질전환된 세포주, 상기 세포주를 이용한 상기 효소의 생산방법, 및 상기 세포주를 배양하여 얻어지는 배양액·세포·세포 처리물을 이용하여 니트릴 화합물로부터 대응하는 아미드 화합물을 제조하는 방법도 제공하는 것이다.

<20> 또한, 본 발명의 다른 목적은 니트릴히드라타제 본래의 활성은 손상시키지 않고, 활성·기질 특이성·Vmax·Km·열안정성·기질에 대한 안정성·생성물에 대한 안정성 등의 성질 중 하나 이상을 변화시키는 것을 포함하는 방법에 관한 구체적 수법을 제공하는 것이다. 구체적으로는, 니트릴히드라타제의 입체 구조에 변화를 미치는 변이를 니트릴히드라타제 유전자에 도입함으로써 상기 성질을 개변하는 방법을 제공하는 것이다. 또한, 개변 방법에 의해 얻어진 니트릴히드라타제, 상기 니트릴히드라타제를 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 플라스미드, 상기 유전자 내지 상기 플라스미드에 의해 형질전환된 세포주, 상기 세포주를 이용한 상기 니트릴히드라타제의 생산방법, 및 상기 세포주를 배양하여 얻어지는 배양액·세포·세포 처리물을 이용하여 니트릴 화합물로부터 대응하는 아미드 화합물을 제조하는 방법도 제공하는 것이다.

과제 해결수단

<21> 본 발명자들은 이러한 상황 하에, 특개평9-275978호 공보(특허문헌 4)에 개시되어 있는 니트릴히드라타제 유전자에, 상기 공보에는 개시되어 있지 않은 신규한 치환 변이 부위를 도입하여, 상기 변이 도입 후의 상기 유전자의 염기 서열을 결정하였다. 게다가, 상기 유전자를 포함하는 플라스미드, 상기 플라스미드에 의해 형질전환된 세포주를 제작하였다. 또한, 상기 세포주를 이용한 상기 효소의 생산이나 상기 세포주를 배양하여 얻어지는 배양액·세포·세포 처리물을 이용한 니트릴 화합물로부터의 대응 아미드 화합물의 제조에 관해서도 예의 검토를 거듭한 결과, 본원 발명을 완성하기에 이르렀다.

효 과

<22> 본 발명은 생체 촉매를 이용한 물질 생산의 분야에 있어서 유용하다. 그 예로는 니트릴히드라타제로 호칭되는 효소 내지 상기 효소를 활성 발현하는 생체를 촉매로 하는 니트릴 화합물의 수화에 의해 대응하는 아미드 화합물로 전환하는 물질 생산을 들 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<23> 본 발명에 관한 니트릴히드라타제의 α-서브유닛은 서열목록의 서열번호: 1로 표시되는 α-서브유닛의 아미노산

서열의 36번째, 71번째, 148번째, 및 204번째의 아미노산 중 어느 하나 이상의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환한 변이를 가지는 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 한다.

<24> 본 발명에 관한 니트릴히드라타제의 β-서브유닛은 서열목록의 서열번호: 2로 표시되는 β-서브유닛의 아미노산 서열의 10번째, 32번째, 37번째, 41번째, 46번째, 48번째, 51번째, 72번째, 118번째, 127번째, 146번째, 160번째, 186번째 및 217번째의 아미노산 중 어느 하나 이상의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환한 변이를 가지는 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 한다.

<25> 본 발명에 관한 니트릴히드라타제는 α-서브유닛 및 β-서브유닛을 가지고, 이들 서브유닛 중 적어도 하나가 상기 변이를 가지는 것을 특징으로 한다.

<26> 본 발명에 관한 니트릴히드라타제의 α-서브유닛을 코딩하는 유전자는, 상기 α-서브유닛에 있어서의 변이를 가지는 아미노산 서열을 코딩하는 것을 특징으로 한다. 본 발명에 관한 니트릴히드라타제의 β-서브유닛을 코딩하는 유전자는 상기 β-서브유닛에 있어서의 변이를 가지는 아미노산 서열을 코딩하는 것을 특징으로 한다.

<27> 본 발명에 관한 니트릴히드라타제를 코딩하는 유전자는 α-서브유닛을 코딩하는 유전자와 β-서브유닛을 코딩하는 유전자를 가지고, 이들 서브유닛 중 적어도 하나가 상기 변이를 가지는 것을 특징으로 한다.

<28> 본 발명의 플라스미드는 상기 유전자 중 어느 하나를 가지는 것을 특징으로 한다.

<29> 본 발명의 형질전환체는 상기 플라스미드를 이용하여 숙주 세포를 형질전환함으로써 얻어진 것을 특징으로 한다.

<30> 본 발명의 니트릴히드라타제의 제조는, 상기 형질전환체, 상기 형질전환체의 배양액, 또는 상기 형질전환체나 상기 배양액의 처리물로부터 니트릴히드라타제를 회수하는 공정을 가지는 것을 특징으로 한다.

<31> 본 발명의 아미드 화합물의 제조 방법은, 수성 매체 중에서 니트릴 화합물을 상기 니트릴히드라타제와 접촉시켜 상기 니트릴 화합물을 대응하는 아미드 화합으로 변환하는 공정을 가지는 것을 특징으로 한다.

<32> 또한, 본 발명자들은 이러한 상황 하에, 특허문헌 2, 특허문헌 4에 개시되어 있는 니트릴히드라타제 유전자를 예로 하여, 신규한 관점에 기초하여 변이의 대상이 되는 영역을 특정하고, 상기 영역을 형성하는 아미노산 잔기에 상당하는 아미노산 서열 중의 아미노산에 치환, 삽입 또는 삭제 등의 변경을 가함으로써 니트릴히드라타제의 개변 방법을 실시하였다. 구체적으로는, 비특허문헌 2, 3, 4 및 PDB 번호 1AHJ·2AHJ·1IRE로서 공개되어 있는 니트릴히드라타제의 입체 구조를 참조하여, 예의 해석을 실시함으로써, 목적에 부합하는 변경 대상 영역을 특정하였다. 보다 구체적으로는, 입체 구조의 해석에 의해, 기질이 효소 외부로부터 활성 중심으로 향할 때에나 생성물이 활성 중심으로부터 효소 외부로 향할 때에 통과하는 공동을 형성하는 영역, 및 2량체 형성에 관여하는 α-서브유닛과 β-서브유닛 사이의 회합 계면이나 2량체끼리의 회합에 관여하는 계면을 형성하는 영역을 특정하였다. 아미노산 서열에 치환, 삽입 또는 삭제 등의 변경을 가하는 방법으로서는 특별히 한정되지 않지만, 유전자 재조합의 기법을 이용한 변이 도입법을 그 예로서 들 수 있다.

<33> 또한, 상기 변경 후의 상기 유전자의 염기 서열을 결정하고, 상기 유전자를 포함하는 플라스미드, 상기 유전자 내지 상기 플라스미드에 의해 형질전환된 세포주를 제작하며, 상기 세포주를 이용한 상기 효소의 생산이나 상기 세포주를 배양하여 얻어지는 배양액·세포·세포 처리물을 이용한 니트릴 화합물로부터의 대응 아미드 화합물의 제조를 실시함으로써, 개변 방법이 니트릴히드라타제의 성질에 어떠한 변화를 미치고 있는지를 관찰하였다. 개변 대상이 되는 니트릴히드라타제를 구성하는 아미노산 서열의 여러 위치로의 변경 및 그것에 의해 얻어진 여러 가지 개변 효소에 관해서 예의 검토를 거듭한 결과, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

<34> 즉, 본 발명은 상술한 특징에 부가하여, 하기 [1] 내지 [22]로 나타내는 바와 같다.

<35> [1] 니트릴히드라타제 활성을 가지는 효소에 있어서, 이하의 공정에 의해 특정의 아미노산 잔기를 특정하여, 특정된 아미노산 잔기 중의 1개소 이상에 치환, 삽입 또는 삭제를 행함으로써, 상기 효소의 활성·기질 특이성·Vmax·Km·열안정성·기질에 대한 안정성·생성물에 대한 안정성 중 어느 하나 이상의 성질을 변화시키는 개변 방법:

<36> (a) 개변 전의 니트릴히드라타제 활성을 가지는 효소의 아미노산 서열을, 서열목록의 서열번호 98 기재의 아미노산 서열 및 서열목록의 서열번호 99 기재의 아미노산 서열과 얼라인먼트하고,

<37> (b) 얼라인먼트 결과로부터, 서열목록의 서열번호 98 기재의 아미노산 서열 중의 36번째 트레오닌으로부터 48번째 아스파라긴에 이르는 영역, 서열목록의 서열번호 99 기재의 아미노산 서열 중의 31번째 리신으로부터 51번째

페닐알라닌에 이르는 영역, 및 112번째 리신으로부터 127번째 류신에 이르는 영역에 상당하는 아미노산 잔기를 특정하여,

<38> (c) 특정된 아미노산 잔기 중의 1개소 이상에 치환, 삽입 또는 삭제를 행함,

<39> [2] 니트릴히드라타제 활성을 가지는 효소에 있어서, 이하의 공정에 의해 특정의 아미노산 잔기를 특정하여, 특정된 아미노산 잔기 중의 1개소 이상에 치환, 삽입 또는 삭제를 행함으로써, 상기 효소의 활성·기질 특이성·Vmax·Km·열안정성·기질에 대한 안정성·생성물에 대한 안정성 중 어느 하나 이상의 성질을 변화시키는 개변 방법:

<40> (d) 개변 전의 니트릴히드라타제 활성을 가지는 효소의 아미노산 서열을, 서열목록의 서열번호 98 기재의 아미노산 서열 및 서열목록의 서열번호 99 기재의 아미노산 서열과 얼라인먼트하고,

<41> (e) 얼라인먼트 결과로부터, 서열목록의 서열번호 98 기재의 아미노산 서열 중의 36·48·71·148·188·204번째에 상당하는 아미노산 잔기, 서열목록의 서열번호 99 기재의 아미노산 서열 중의 10·32·33·37·40·41·46·48·51·61·72·112·118·127·146·150·160·168·171·176·186·217·218번째에 상당하는 아미노산 잔기를 특정하여,

<42> (f) 특정된 아미노산 잔기 중의 1개소 이상에 치환, 삽입 또는 삭제를 행함,

<43> [3] 니트릴히드라타제 활성을 가지는 효소에 있어서, 이하의 공정에 의해 특정의 아미노산 잔기를 특정하여, 특정된 아미노산 잔기 중의 1개소 이상에 치환, 삽입 또는 삭제를 행함으로써, 상기 효소의 활성·기질 특이성·Vmax·Km·열안정성·기질에 대한 안정성·생성물에 대한 안정성 중 어느 하나 이상의 성질을 변화시키는 개변 방법:

<44> (g) 개변 전의 니트릴히드라타제 활성을 가지는 효소의 입체 구조를, PDB(Protein Data Bank) 번호 1IRE 기재의 니트릴히드라타제 입체 구조와 아미노산 서열에 기초한 얼라인먼트를 행함으로써 추정하고,

<45> (h) 추정된 입체 구조에 근거하여, PDB 번호 1IRE 기재의 니트릴히드라타제 입체 구조 중의 A 사슬(Chain 1IRE: A)에서의 N 말단으로부터 세어 2번째의 헬릭스, 및 B 사슬(Chain 1IRE: B)에서의 N 말단으로부터 세어 1번째의 헬릭스, 2번째의 헬릭스, 및 그것들 사이에 끼워진 루프 부분과 C 말단으로부터 세어 3번째의 헬릭스에 상당하는 영역의 아미노산 잔기를 특정하여,

<46> (i) 특정된 아미노산 잔기 중의 1개소 이상에 치환, 삽입 또는 삭제를 행함,

<47> [4] 니트릴히드라타제 활성을 가지는 효소에 있어서, 이하의 공정에 의해 특정의 아미노산 잔기를 특정하여, 특정된 아미노산 잔기 중의 1개소 이상에 치환, 삽입 또는 삭제를 행함으로써, 상기 효소의 활성·기질 특이성·Vmax·Km·열안정성·기질에 대한 안정성·생성물에 대한 안정성 중 어느 하나 이상의 성질을 변화시키는 개변 방법:

<48> (j) 개변 전의 니트릴히드라타제 활성을 가지는 효소의 입체 구조를, PDB 번호 1IRE 기재의 니트릴히드라타제 입체 구조와, 아미노산 서열에 기초한 얼라인먼트를 행함으로써 추정하고,

<49> (k) 추정된 입체 구조에 근거하여, PDB 번호 1IRE 기재의 니트릴히드라타제 입체 구조 중의 A 사슬에 있어서의 N 말단으로부터 89번째의 아미노산 잔기인 글루타민, 165번째의 아미노산 잔기인 글루탐산에 상당하는 아미노산 잔기, 및 B 사슬의 N 말단으로부터 37번째의 아미노산 잔기인 페닐알라닌, 48번째의 아미노산인 류신에 상당하는 4개의 아미노산 잔기를 특정하고,

<50> (l) 특정된 4개의 아미노산 잔기의 측쇄 선단 중원자(重原子)를 각각 중심점으로 한 입체 구조상 반경 5Å 이내의 범위에 측쇄 선단 중원자가 포함되는 아미노산 잔기를 특정하여,

<51> (m) 상기 l에서 특정된 아미노산 잔기 중의 1개소 이상에 치환, 삽입 또는 삭제를 행함,

<52> [5] 니트릴히드라타제 활성을 가지는 효소에 있어서, 이하의 공정에 의해 특정의 아미노산 잔기를 특정하여, 특정된 아미노산 잔기 중의 1개소 이상에 치환, 삽입 또는 삭제를 행함으로써, 상기 효소의 활성·기질 특이성·Vmax·Km·열안정성·기질에 대한 안정성·생성물에 대한 안정성 중 어느 하나 이상의 성질을 변화시키는 개변 방법:

<53> (n) 개변 전의 니트릴히드라타제 활성을 가지는 효소의 입체 구조를, PDB 번호 1IRE 기재의 니트릴히드라타제 입체 구조와, 아미노산 서열에 기초한 얼라인먼트를 행함으로써 추정하고,

<54> (o) 추정된 입체 구조에 근거하여, 기질이 효소 외부로부터 활성 중심으로 향할 때에나 생성물이 활성 중심으로부터 효소 외부로 향할 때에 통과하는 공동을 형성하는 영역을 특정하고,

<55> (p) 특정된 영역을 구성하는 아미노산 잔기 중, 그것을 변경하는 것이 공동의 크기를 변화시키고, 나아가서는 기질/생성물의 통과 용이성/곤란성을 제어하는 아미노산 잔기를 특정하여,

<56> (q) 상기 p에서 특정된 아미노산 잔기 중의 1개소 이상에 치환, 삽입 또는 삭제를 행함,

<57> [6] 니트릴히드라타제 활성을 가지는 효소에 있어서, 이하의 공정에 의해 특정의 아미노산 잔기를 특정하여, 특정된 아미노산 잔기 중의 1개소 이상에 치환, 삽입 또는 삭제를 행함으로써, 상기 효소의 활성·기질 특이성·Vmax·Km·열안정성·기질에 대한 안정성·생성물에 대한 안정성 중 어느 하나 이상의 성질을 변화시키는 개변 방법:

<58> (r) 개변 전의 니트릴히드라타제 활성을 가지는 효소의 입체 구조를, PDB 번호 1IRE 기재의 니트릴히드라타제 입체 구조와, 아미노산 서열에 기초한 얼라인먼트를 행함으로써 추정하고,

<59> (s) 추정된 입체 구조에 근거하여, PDB 번호 1IRE 기재의 니트릴히드라타제 입체 구조 중의 A 사슬에 있어서의 N 말단으로부터 89번째의 아미노산인 글루타민(A89Q), 165번째의 아미노산인 글루탐산(A165E)에 상당하는 아미노산 잔기, 및 B 사슬의 N 말단으로부터 37번째의 아미노산인 페닐알라닌(B37F), 48번째의 아미노산인 류신(B48L)에 상당하는 아미노산 잔기의 4개의 아미노산 잔기를 특정하고,

<60> (t) A165E에 상당하는 아미노산 잔기와 B48L에 상당하는 아미노산 잔기와의 최단 중원자간 거리를 d1, A89Q에 상당하는 아미노산 잔기와 B48L에 상당하는 아미노산 잔기와의 최단 중원자간 거리를 d2, B37F에 상당하는 아미노산 잔기와 B48L에 상당하는 아미노산 잔기와의 최단 중원자간 거리를 d3으로 규정하여, d1 내지 d3 중 하나 이상을 변화시키는 아미노산 잔기를 특정하여,

<61> (u) 특정된 아미노산 잔기 중의 1개소 이상에 치환, 삽입 또는 삭제를 행함,

<62> [7](t)의 공정이 이하의 (t')와 같은 [6]에 기재된 개변 방법:

<63> (t') A165E에 상당하는 아미노산 잔기와 B48L에 상당하는 아미노산 잔기와의 최단 중원자간 거리를 d1, A89Q에 상당하는 아미노산 잔기와 B48L에 상당하는 아미노산 잔기와의 최단 중원자간 거리를 d2, B37F에 상당하는 아미노산 잔기와 B48L에 상당하는 아미노산 잔기와의 최단 중원자간 거리를 d3, A165E에 상당하는 아미노산 잔기와 B37F에 상당하는 아미노산 잔기와의 최단 중원자간 거리를 d4, A89Q에 상당하는 아미노산 잔기와 B37F에 상당하는 아미노산 잔기와의 최단 중원자간 거리를 d5로 규정하여, d1 내지 d5 중 하나 이상을 변화시키는 아미노산 잔기를 특정함,

<64> [8] 개변 전의 니트릴히드라타제 활성을 가지는 효소가 하기 [A]와 [B]의 2종류의 폴리펩티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 [1] 내지 [7] 중 어느 한 항에 기재된 개변 방법:

<65> [A] 서열목록의 서열번호 98 기재의 아미노산 서열과 40% 이상의 상동성을 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드,

<66> [B] 서열목록의 서열번호 99 기재의 아미노산 서열과 25% 이상의 상동성을 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드,

<67> [9] [A]의 폴리펩티드가 하기 [C]의 폴리펩티드이며, [B]의 폴리펩티드가 하기 [D]의 폴리펩티드인 것을 특징으로 하는 [8]에 기재된 개변 방법:

<68> [C] 서열목록의 서열번호 98 기재의 아미노산 서열, 서열목록의 서열번호 98 기재의 아미노산 서열의 적어도 1개소에 관해 치환, 삽입 또는 삭제를 행한 아미노산 서열, 서열목록의 서열번호 98 기재의 아미노산 서열의 6·19·38·77·90·102·106·126·130·142·146·187·194·203번째의 아미노산 중 적어도 1개의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환한 아미노산 서열 중 임의의 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드,

<69> [D] 서열목록의 서열번호 99 기재의 아미노산 서열, 서열목록의 서열번호 99 기재의 아미노산 서열의 적어도 1개소에 관해 치환, 삽입 또는 삭제를 행한 아미노산 서열, 서열목록의 서열번호 99 기재의 아미노산 서열의 20·21·108·200·212번째의 아미노산 중 적어도 1개의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환한 아미노산 서열 중 임의의 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드,

<70> [10] [A]의 폴리펩티드가 하기 [E]의 폴리펩티드이며, [B]의 폴리펩티드가 하기 [F]의 폴리펩티드인 것을 특징

으로 하는 [8]에 기재된 개변 방법:

<71> [E] 서열목록의 서열번호 104 기재의 염기 서열의 704번째 내지 1315번째로 이루어지는 ORF(오픈 리딩 프레임)가 코딩하는 아미노산 서열과 상동인 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드,

<72> [F] 서열목록의 서열번호 104 기재의 염기 서열의 1번째 내지 680번째로 이루어지는 ORF가 코딩하는 아미노산 서열과 상동인 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드,

<73> [11] 개변 전의 니트릴히드라타제 활성을 가지는 효소가 구성요소로서 포함하는 2종의 폴리펩티드 중, 하나가 [10]에 기재된 [E]의 폴리펩티드이며, 또 하나의 폴리펩티드가 [10]에 기재된 [F]의 폴리펩티드인 것을 특징으로 하고, 또한 이하의 공정에 의해 특정의 아미노산 잔기를 특정하여, 특정된 아미노산 잔기 중의 1개소 이상에 치환, 삽입 또는 삭제를 행함으로써, 상기 효소의 활성, 기질 특이성, Vmax, Km, 열안정성, 기질에 대한 안정성, 생성물에 대한 안정성 중 어느 하나 이상의 성질을 변화시키는 개변 방법:

<74> (d') 개변 전의 니트릴히드라타제 활성을 가지는 효소의 아미노산 서열을, 서열목록의 서열번호 99 기재의 아미노산 서열과 얼라인먼트하고,

<75> (e') 얼라인먼트 결과로부터, 서열목록의 서열번호 99 기재의 아미노산 서열 중의 48·51번째에 상당하는 아미노산 잔기를 특정하여,

<76> (f') 특정된 아미노산 잔기 중의 1개소 이상에 치환, 삽입 또는 삭제를 행함,

<77> [12] [A]의 폴리펩티드가 하기 [G]의 폴리펩티드인 것을 특징으로 하는 [8]에 기재된 개변 방법:

<78> [G] 아미노산 서열 $X_1CXLC_1SC_2X_2X_3X_4X_5$로 표시되는 영역을 포함하는 폴리펩티드(여기에서, C는 시스테인을, X는 세린 또는 트레오닌을, L은 류신을, C_1은 시스테인 술핀산(CYSTEINE SULFINIC ACID·3-SULFINOALANINE)을, S는 세린을, C_2는 시스테인 술펜산(CYSTEINE SULFENIC ACID·S-HYDROXY-CYSTEINE)을, X_1·X_2·X_3·X_4·X_5는 임의의 아미노산을 나타낸다.),

<79> [13] X_1이 발린, X_4가 트립토판, X_5가 프롤린인 것을 특징으로 하는 [12]에 기재된 개변 방법,

<80> [14] X_2가 티로신, X_3가 프롤린인 것을 특징으로 하는 [13]에 기재된 개변 방법,

<81> [15] $X_1CXLC_1SC_2X_2X_3X_4X_5$로 표시되는 영역을 통해 금속 원자와 결합하고 있는 것을 특징으로 하는 [12] 내지 [14] 중 어느 한 항에 기재된 개변 방법,

<82> [16] 금속 원자가 코발트 원자인 것을 특징으로 하는 [15]에 기재된 개변 방법,

<83> [17] [1] 내지 [16] 중 어느 한 항에 기재된 개변 방법에 의해 얻어지는 것을 특징으로 하는 개변 효소,

<84> [18] [17]에 기재된 개변 효소를 코딩하는 유전자,

<85> [19] [18]에 기재된 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 플라스미드,

<86> [20] 미생물을 [18]에 기재된 유전자 또는 [19]에 기재된 플라스미드를 이용하는 형질전환을 행함으로써 얻어지는 것을 특징으로 하는 형질전환체,

<87> [21] [20]에 기재된 형질전환체를 배양하여 얻어지는 배양액, 세포, 또는 그것들의 처리물로부터 개변 효소를 회수하는 공정을 포함하는 것을 특징으로 하는 개변 효소의 조제 방법,

<88> [22] [20]에 기재된 형질전환체를 배양하여 얻어지는 배양액, 세포, 또는 그것들의 처리물, 또는 [21]에 기재된 조제 방법에 의해 얻어지는 개변 효소를 니트릴 화합물과 용매 중에서 접촉시킴으로써 상기 니트릴 화합물을 대응하는 아미드 화합물로 전화(轉化)시키는 공정을 포함하는 것을 특징으로 하는 아미드 화합물 제조 방법.

<89> 본 발명에 의해, 슈도노카르디아 서모필라 유래의 니트릴히드라타제의 본질적인 기능을 변화시키지 않는 신규한 변이점을 가지는 니트릴히드라타제의 아미노산 서열 및 상기 유전자의 염기 서열이 제공된다. 게다가, 상기 유전자를 포함하는 플라스미드, 상기 플라스미드를 포함하는 형질전환체, 상기 형질전환체를 이용한 상기 효소의 생산 방법, 및 상기 형질전환체를 이용한 니트릴 화합물로부터의 대응하는 아미드 화합물의 제조 방법이 제공된다.

<90> 또한, 본 발명에 의해, 니트릴히드라타제 활성을 가지는 효소의 입체 구조를 변화시키는 것을 특징으로 하는

수법을 이용하여, 개변 전의 니트릴히드라타제 활성을 가지는 효소를 개변하는 방법이 제공된다. 상기 방법을 이용하는 개변 방법으로서는, 활성・기질 특이성・Vmax・Km・열안정성・기질에 대한 안정성・생성물에 대한 안정성 등의 성질들 중 하나 이상이 개변되는 것을 특징으로 하는 효과가 얻어짐을 그 효과로서 들 수 있다. 또한, 본 발명에 의해, 신규한 변이점을 가지는 니트릴히드라타제, 상기 효소를 구성하는 폴리펩티드 사슬을 코딩하는 유전자가 제공된다. 또한, 상기 유전자를 포함하는 플라스미드, 상기 유전자 내지 상기 플라스미드를 포함하는 형질전환체, 상기 형질전환체를 이용한 상기 효소의 생산 방법, 및 상기 형질전환체를 이용한 니트릴 화합물로부터의 대응하는 아미드 화합물의 제조 방법이 제공된다.

<91> 발명을 실시하기 위한 최선의 형태

<92> 이하, 본 발명에 대해 더욱 상세하게 설명한다.

<93> 본 발명의 니트릴히드라타제는 니트릴히드라타제 활성을 가지는 효소에 변이를 도입하여 얻어지는 것으로서, 예를 들면 슈도노카르디아 서모필라 유래의 니트릴히드라타제에 변이를 도입하여 얻어진 것이다. 그러한 것은 구체적으로는 서열목록의 서열번호: 1 및 2로 표시되는 아미노산 서열의 소정의 부위 중 적어도 1개 이상에 있어서의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환함으로써 기본적으로 구성된다. 즉, 본 발명은 서열목록의 서열번호: 1로 표시되는 205개의 아미노산의 서열에 의해 표시되는 α-서브유닛 중 적어도 1개 이상을 다른 아미노산으로 치환한 것을 구성요소로 하는 니트릴히드라타제, 서열목록의 서열번호: 2로 표시되는 233개의 아미노산의 서열에 의해 표시되는 적어도 1개 이상을 다른 아미노산으로 치환한 것을 구성요소로 하는 니트릴히드라타제 및 그 양쪽 모두를 구성요소로 하는 니트릴히드라타제를 포함하고 있다.

<94> 본 발명에 있어서의 슈도노카르디아 서모필라 유래의 니트릴히드라타제에 변이를 도입하여 얻어진 니트릴히드라타제에 이용되는 구체적인 아미노산 서열에는 이하의 것이 포함된다.

<95> (a-0) 서열번호: 1의 α-서브유닛의 아미노산 서열;

<96> (a-1) 서열번호: 1로 표시되는 α-서브유닛의 아미노산 서열의 36번째, 71번째, 148번째, 및 204번째의 아미노산 중 어느 하나 이상의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환한 변이를 가지는 아미노산 서열;

<97> (a-2) 서열목록의 서열번호: 1로 표시되는 α-서브유닛의 아미노산 서열의 6번째, 19번째, 38번째, 77번째, 90번째, 102번째, 106번째, 126번째, 130번째, 142번째, 146번째, 187번째, 194번째, 및 203번째의 아미노산 중 어느 하나 이상의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환한 변이를 가지는 아미노산 서열;

<98> (b-0) 서열목록의 서열번호: 2로 표시되는 β-서브유닛의 아미노산 서열;

<99> (b-1) 서열목록의 서열번호: 2로 표시되는 β-서브유닛의 아미노산 서열의 10번째, 32번째, 37번째, 41번째, 46번째, 48번째, 51번째, 72번째, 118번째, 127번째, 146번째, 160번째, 186번째 및 217번째의 아미노산 중 어느 하나 이상의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환한 변이를 가지는 아미노산 서열;

<100> (b-2) 서열목록의 서열번호: 2로 표시되는 β-서브유닛의 아미노산 서열의 20번째, 21번째, 108번째, 200번째, 및 212번째의 아미노산 중 어느 하나 이상의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환한 변이를 가지는 아미노산 서열.

<101> 상기 각 변이는 변이 전의 니트릴히드라타제 활성을 적어도 유지할 수 있는 것이다.

<102> 본 발명에 있어서의 슈도노카르디아 서모필라 유래의 니트릴히드라타제에 변이를 도입하여 얻어진 니트릴히드라타제는 상기(a-0) 내지 (b-2) 중에서 선택된 아미노산 서열을 가지는 이하의 구성요소로 이루어진다.

<103> (A-1) α-서브유닛이 상기(a-1)의 변이를 포함하는 아미노산 서열을 가지는 니트릴히드라타제;

<104> (A-2) α-서브유닛이 상기(a-1) 및 (a-2)의 변이를 포함하는 아미노산 서열을 가지는 니트릴히드라타제;

<105> (B-1) β-서브유닛이 상기(b-1)의 변이를 포함하는 아미노산 서열을 가지는 니트릴히드라타제;

<106> (B-2) β-서브유닛이 상기(b-1) 및 (b-2)의 변이를 포함하는 아미노산 서열을 가지는 니트릴히드라타제;

<107> (A-3) α-서브유닛이 상기(a-1)의 변이를 포함하는 아미노산 서열을 가지고, β-서브유닛이 상기(b-0)의 아미노산 서열을 가지는 니트릴히드라타제;

<108> (A-4) α-서브유닛이 상기(a-1)의 변이를 포함하는 아미노산 서열을 가지고, β-서브유닛이 상기(b-1)의 변이를 포함하는 아미노산 서열을 가지는 니트릴히드라타제;

<109> (A-5) α-서브유닛이 상기(a-1)의 변이를 포함하는 아미노산 서열을 가지고, β-서브유닛이 상기(b-2)의 변이를 포함하는 아미노산 서열을 가지는 니트릴히드라타제;

<110> (A-6) α-서브유닛이 상기(a-1)의 변이를 포함하는 아미노산 서열을 가지고, β-서브유닛이 상기(b-1) 및 (b-2)의 변이를 포함하는 아미노산 서열을 가지는 니트릴히드라타제;

<111> (A-7) α-서브유닛이 상기(a-1) 및 (a-2)의 변이를 포함하는 아미노산 서열을 가지고, β-서브유닛이 상기(b-0)의 아미노산 서열을 가지는 니트릴히드라타제;

<112> (A-8) α-서브유닛이 상기(a-1) 및 (a-2)의 변이를 포함하는 아미노산 서열을 가지고, β-서브유닛이 상기(b-1)의 변이를 포함하는 아미노산 서열을 가지는 니트릴히드라타제;

<113> (A-9) α-서브유닛이 상기(a-1) 및 (a-2)의 변이를 포함하는 아미노산 서열을 가지고, β-서브유닛이 상기(b-2)의 변이를 포함하는 아미노산 서열을 가지는 니트릴히드라타제;

<114> (A-10) α-서브유닛이 상기(a-1) 및 (a-2)의 변이를 포함하는 아미노산 서열을 가지고, β-서브유닛이 상기(b-1) 및 (b-2)의 변이를 포함하는 아미노산 서열을 가지는 니트릴히드라타제;

<115> (B-3) α-서브유닛이 상기(a-0)의 아미노산 서열을 가지고, β-서브유닛이 상기(b-1)의 변이를 포함하는 아미노산 서열을 가지는 니트릴히드라타제;

<116> (B-4) α-서브유닛이 상기(a-0)의 아미노산 서열을 가지고, β-서브유닛이 상기(b-1) 및 (b-2)의 변이를 포함하는 아미노산 서열을 가지는 니트릴히드라타제;

<117> (B-5) α-서브유닛이 상기(a-2)의 변이를 포함하는 아미노산 서열을 가지고, β-서브유닛이 상기(b-1) 및 (b-2)의 변이를 포함하는 아미노산 서열을 가지는 니트릴히드라타제.

<118> 또한, 상기 특정된 변이 부위 이외의 아미노산에 대해서는, 상기 특정 부위의 변이에 의한 목적으로 하는 니트릴히드라타제 활성을 손상시키지 않는 범위 내에서, 아미노산의 치환, 삽입, 결실이 일어나도 된다.

<119> 본 발명에 있어서, 슈도노카르디아 서모필라 유래의 니트릴히드라타제에 변이를 도입하여 얻어진 니트릴히드라타제 유전자에는 니트릴히드라타제의 α-서브유닛을 코딩하는 유전자 및 니트릴히드라타제의 β-서브유닛을 코딩하는 유전자가 포함된다.

<120> 본 발명에 관한 유전자의 한 군으로서는 슈도노카르디아 서모필라 유래의 니트릴히드라타제 유전자에 변이 도입을 행한 것을 들 수 있고, 이것에는 α-서브유닛의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자; β-서브유닛을 코딩하는 유전자; 및 α-서브유닛을 코딩하는 유전자와 β-서브유닛을 코딩하는 유전자의 양쪽 모두를 가지는 니트릴히드라타제 유전자가 포함된다.

<121> 구체적으로는, 이하의 것을 들 수 있다.

<122> (G-1) 상술한 (a-1)의 변이를 가지는 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열을 가지는 유전자;

<123> (G-2) 상술한 (a-1) 및 (a-2)의 변이를 가지는 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열을 가지는 유전자;

<124> (G-3) 상술한 (b-1)의 변이를 가지는 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열을 가지는 유전자;

<125> (G-4) 상술한 (b-1) 및 (b-2)의 변이를 가지는 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열을 가지는 유전자; 및

<126> (G-5) 상술한 (A-1) 내지 (B-4) 중 어느 하나의 니트릴히드라타제를 코딩하는 염기 서열을 가지는 유전자.

<127> 상기 변이의 기초가 되는 서열번호: 1의 α-서브유닛의 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열로서는 서열번호: 3의 염기 서열이 바람직하다. 또한, 상기 변이의 기초가 되는 서열번호: 2의 β-서브유닛의 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열로서는 서열번호: 4의 염기 서열이 바람직하다.

<128> 예를 들면, 서열번호: 3을 기초로 한 경우의 상기(a-1)의 변이는 서열번호: 3의 염기 서열의 106번째 내지 108번째, 211번째 내지 213번째, 442번째 내지 444번째, 및 610번째 내지 612번째 중 어느 하나 이상의 염기 서열을 다른 염기 서열로 치환하여 얻을 수 있다.

<129> 또한, 서열번호: 3을 기초로 한 경우의 상기(a-2)의 변이는 서열번호: 3의 염기 서열의 16번째 내지 18번째, 55번째 내지 57번째, 112번째 내지 114번째, 229번째 내지 231번째, 268번째 내지 270번째, 304번째 내지 306번째, 316번째 내지 318번째, 376번째 내지 378번째, 388번째 내지 390번째, 424번째 내지 426번째, 436번

째 내지 438번째, 559번째 내지 561번째, 580번째 내지 582번째, 및 607번째 내지 609번째 중 어느 하나 이상의 염기 서열을 다른 염기 서열로 치환한 염기 서열의 일부를 치환하여 얻을 수 있다.

<130> 한편, 서열번호: 4를 기초로 한 경우의 상기(b-1)의 변이는 서열번호: 4의 염기 서열의 28번째 내지 30번째, 94번째 내지 96번째, 109번째 내지 111번째, 121번째 내지 123번째, 136번째 내지 138번째, 142번째 내지 144번째, 151번째 내지 153번째, 214번째 내지 216번째, 352번째 내지 354번째, 379번째 내지 381번째, 436번째 내지 438번째, 478번째 내지 480번째, 556번째 내지 558번째, 및 649번째 내지 651번째 중 어느 하나 이상의 염기 서열을 다른 염기 서열로 치환하여 얻을 수 있다.

<131> 또한, 서열번호: 4를 기초로 한 경우의 상기(b-2)의 변이는 서열번호: 4의 염기 서열의 58번째 내지 60번째, 61번째 내지 63번째, 322번째 내지 324번째, 598번째 내지 600번째, 및 634번째 내지 636번째 중 어느 하나 이상의 염기 서열을 다른 염기 서열로 치환한 염기 서열의 일부를 치환하여 얻을 수 있다.

<132> 이들의 치환은 각 유전자가 코딩하는 α- 및 β-서브유닛 중 적어도 하나가 삽입된 니트릴히드라타제의 활성이 치환전 상태를 유지, 또는 그것보다 향상하는 바와 같은 범위 내에서 행해진다. 또한, 변이 도입 수단에 관해서는 특별히 한정되지 않는다.

<133> 본 발명의 니트릴히드라타제 유전자에 있어서의 상기(a-1),(a-2),(b-1) 및 (b-2)의 변이 부위 이외의 부위에 대해서는, 그것이 니트릴히드라타제 활성을 가지는 단백질의 주형(鑄型)으로서 기능할 수 있는 범위 내에서, 염기의 치환, 삽입 또는 삭제에 의한 추가된 변이를 가지는 것이어도 된다.

<134> 이와 같은 추가된 변이에 대해서는 이하와 같은 예를 들 수 있다. 어느 일정한 염기 서열을 가지는 유전자를 주형으로 하여 전사·번역된 경우에 있어서도, 그것을 도입하는 숙주 세포의 종류나 배양에 사용하는 영양 배지의 성분이나 조성 또는 배양시의 온도나 pH 등에 따라서는, 유전자 발현 후의 숙주 세포내 효소에 의한 수식 등에 의해, 소기의 효소 작용은 유지되지만, 서열목록에 있어서의 N 말단 부근의 아미노산의 1개 또는 2개 이상이 결실되거나 N 말단에 1개 또는 2개 이상의 아미노산이 새로이 부가된 이형체를 생산할 수 있다. 그 때문에, 그러한 이형인 니트릴히드라타제도 본 발명에 포함되는 것으로 한다.

<135> 한편, 본 발명의 니트릴히드라타제 생산용 플라스미드는 상기 니트릴히드라타제 유전자를 이용하여 조제할 수 있다. 구체적인 예로서는 이하의 것을 들 수 있다.

<136> (P-1) 상술한 (a-1)의 변이를 가지는 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열을 가지는 플라스미드;

<137> (P-2) 상술한 (a-1) 및 (a-2)의 변이를 가지는 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열을 가지는 플라스미드;

<138> (P-3) 상술한 (b-1)의 변이를 가지는 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열을 가지는 플라스미드;

<139> (P-4) 상술한 (b-1) 및 (b-2)의 변이를 가지는 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열을 가지는 플라스미드; 및

<140> (P-5) 상술한 (A-1) 내지 (B-4) 중 어느 하나의 니트릴히드라타제를 코딩하는 염기 서열을 가지는 플라스미드.

<141> 또한, 본 발명에 관한 형질전환체 또는 세포주는, 상기 플라스미드를 이용하여 임의의 숙주 세포를 형질전환하여 얻어진 것이다. 본 발명의 니트릴히드라타제의 생산 방법은, 상기 형질전환체나 세포주를 배양하여 니트릴히드라타제를 생산시키는 공정을 가진다. 또한, 본 발명의 아미드 화합물의 제조 방법은, 이러한 니트릴히드라타제를 생산하는 형질전환체나 세포주를 배양하여 얻어지는 배양액, 세포 또는 세포 처리물을 매체 중에서 니트릴 화합물과 접촉시켜 대응하는 아미드 화합물을 제조시키는 공정을 가진다.

<142> 이하, 본 발명의 니트릴히드라타제 활성을 가지는 효소의 개변 방법에 관해서 상세하게 설명한다.

<143> 본 발명에 있어서, 니트릴히드라타제 활성이란, 니트릴 화합물을 대응하는 아미드 화합물로 수화하는 활성을 말한다. 상기 활성을 가지는 효소란, 일반적으로는 α-서브유닛, β-서브유닛으로 불리우는 2종의 폴리펩티드 사슬을 구성요소로 하는 것을 특징으로 하고, 니트릴히드라타제 유전자란, 이들 2종의 폴리펩티드 사슬을 형성하는 것을 특징으로 하는 2개의 아미노산 서열 내지 그것들을 코딩하는 것을 특징으로 하는 2개의 ORF(오픈 리딩 프레임)를 이루는 염기 서열을 가리킨다.

<144> 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제(서열목록의 서열번호 98 및 99, 특허문헌 3, 비특허문헌 4, PDB 번호: 1IRE 참조)를 예로서 구체적으로 기술하면, 서열목록의 서열번호 98 기재의 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드 및 PDB 번호 1IRE 기재의 니트릴히드라타제 입체 구조 중의 A 사슬이 α-서브유닛, 서열목록의 서열번호 99 기재의 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드 및 PDB 번호 1IRE 기재의 니트릴히드라타제

입체 구조 중의 B 사슬이 β-서브유닛이다. 또한, 서열목록의 서열번호 100 기재의 염기 서열로 이루어지는 ORF와 서열목록의 서열번호 101 기재의 염기 서열로 이루어지는 ORF를 니트릴히드라타제 유전자라고 한다.

<145> 또한, 로도코커스 로도크로우스(*Rhodococcus rhodochrous*) J-1주 유래의 니트릴히드라타제(서열목록의 서열번호 104, 특허문헌 2, 비특허문헌 1 참조)의 경우, 서열목록의 서열번호 104 기재의 염기 서열의 704번째 내지 1315번째로 이루어지는 ORF가 코딩하는 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드가 α-서브유닛, 서열목록의 서열번호 104 기재의 염기 서열의 1번째 내지 690번째로 이루어지는 ORF가 코딩하는 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드가 β-서브유닛이다. 또한, 서열목록의 서열번호 104 기재의 염기 서열이 코딩하는 2개의 ORF를 니트릴히드라타제 유전자라고 한다.

<146> 본 발명에 있어서의 개변 방법이란, 니트릴히드라타제 본래의 활성은 손상시키지 않고, 상기 효소의 활성·기질 특이성·Vmax·Km·열안정성·기질에 대한 안정성·생성물에 대한 안정성 중 어느 하나 이상의 성질을 변화시키는 목적 하에, 개변 전의 니트릴히드라타제 활성을 가지는 효소의 입체 구조를 변화시키는 것을 지향하는 수법이며, 그 특징으로서 입체 구조의 해석에 의해, 기질이 효소 외부로부터 활성 중심으로 향할 때에나 생성물이 활성 중심으로부터 효소 외부로 향할 때에 통과하는 공동을 형성하는 영역 및/또는 2량체 형성에 관여하는 α-서브유닛과 β-서브유닛간의 회합 계면이나 또는 2량체끼리의 회합에 관여하는 계면을 형성하는 영역을 특정하고, 상기 영역에 존재하는 아미노산 잔기에 상당하는 아미노산 서열 중의 아미노산의 어느 1개소 이상에 치환, 삽입 또는 삭제 등의 변경을 가하는 공정을 포함하는 것을 들 수 있다.

<147> 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제(서열목록의 서열번호 98 및 99·특허문헌 3·비특허문헌 4·PDB 번호: 1IRE 참조)를 예로서 구체적으로 기술하면, 기질이 효소 외부로부터 활성 중심으로 향할 때에나 생성물이 활성 중심으로부터 효소 외부로 향할 때에 통과하는 공동을 형성하는 영역에 존재하는 아미노산 잔기에 상당하는 것은 PDB 번호 1IRE 기재의 니트릴히드라타제 입체 구조 중의 B 사슬에 있어서의 N 말단으로부터 세어 1번째의 헬릭스·2번째의 헬릭스·그것들 사이에 끼워진 루프 부분에 상당하는 영역을 형성하는 아미노산 잔기, PDB 번호 1IRE 기재의 니트릴히드라타제 입체 구조 중의 A 사슬에 있어서의 N 말단으로부터 89번째의 아미노산 잔기인 글루타민·165번째의 아미노산 잔기인 글루탐산에 상당하는 아미노산 잔기, 및 B 사슬의 N 말단으로부터 37번째의 아미노산 잔기인 페닐알라닌·48번째의 아미노산인 류신에 상당하는 4개의 아미노산 잔기의 측쇄 선단 중원자를 각각 중심점으로 한 입체 구조상 반경 5Å 내의 영역에 측쇄 선단 중원자가 포함되는 아미노산 잔기, 서열목록의 서열번호 98 기재의 아미노산 서열 중의 36번째 트레오닌으로부터 48번째 아스파라긴에 이르는 영역, 서열목록의 서열번호 99 기재의 아미노산 서열 중의 31번째 리신으로부터 51번째 페닐알라닌에 이르는 영역, 및 112번째 리신으로부터 127번째 류신에 이르는 영역에 상당하는 아미노산 잔기, 서열목록의 서열번호 99 기재의 아미노산 서열 중의 37·40·41·46·48·51·61·72·112·118·127번째에 상당하는 아미노산 잔기 등을 들 수 있다.

<148> 또한, 2량체 형성에 관여하는 α-서브유닛과 β-서브유닛 사이의 회합 계면이나 2량체끼리의 회합에 관여하는 계면을 형성하는 영역에 존재하는 아미노산 잔기에 상당하는 것은, PDB 번호 1IRE 기재의 니트릴히드라타제 입체 구조 중의 A 사슬에 있어서의 N 말단으로부터 세어 2번째의 헬릭스, B 사슬에 있어서의 N 말단으로부터 세어 2번째의 헬릭스, 서열목록의 서열번호 98 기재의 아미노산 서열 중의 36번째 트레오닌으로부터 48번째 아스파라긴에 이르는 영역, 서열목록의 서열번호 99 기재의 112번째 리신으로부터 127번째 류신에 이르는 영역에 상당하는 아미노산 잔기, 서열목록의 서열번호 98 기재의 아미노산 서열 중의 36·71·148·188·204번째에 상당하는 아미노산 잔기, 서열목록의 서열번호 99 기재의 아미노산 서열 중의 10·32·33·112·118·127·146·150·160·168·171·176·186·217·218번째에 상당하는 아미노산 잔기 등을 들 수 있다.

<149> 또한, 기질이 효소 외부로부터 활성 중심으로 향할 때에나 생성물이 활성 중심으로부터 효소 외부로 향할 때에 통과하는 공동을 형성하는 영역을 구성하는 아미노산 잔기 중, 그것을 변경하는 것이 공동의 크기를 변화시키고, 나아가서는 기질/생성물의 통과 용이성/곤란성을 제어하는 아미노산 잔기를 특정하는 방법으로서는, PDB 번호 1IRE 기재의 니트릴히드라타제 입체 구조 중의 A 사슬에 있어서의 N 말단으로부터 89번째의 아미노산인 글루타민(A89Q), 165번째의 아미노산인 글루탐산(A165E)에 상당하는 아미노산 잔기, 및 B 사슬의 N 말단으로부터 37번째의 아미노산인 페닐알라닌(B37F), 48번째의 아미노산인 류신(B48L)에 상당하는 4개의 아미노산 잔기를 특정하고, A165E와 B48L의 최단 중원자간 거리를 d1, A89Q와 B48L의 최단 중원자간 거리를 d2, B37F와 B48L의 최단 중원자간 거리를 d3, A165E와 B37F의 최단 중원자간 거리를 d4, A89Q와 B37F의 최단 중원자간 거리를 d5로 규정하여, d1 내지 d5 중 하나 이상을 변화시키는 아미노산 잔기를 특정하는 것, 상기 d1 내지 d3 중 하나 이상을 변화시키는 아미노산 잔기를 특정하는 것 등을 들 수 있다.

<150> 따라서, 대상이 되는 니트릴히드라타제(슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 것을 그 대표예로서 들 수 있다.)에 대해서, 상기와 같이 하여 특정한 어느 하나 이상의 아미노산 잔기에 상당하는 아미노산 서열 중의 아미노산에 치환, 삽입 또는 삭제 등의 변경을 가하는 공정으로 이루어지는 개변 방법은 본 발명에 포함된다.

<151> 또한, 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 이외의 생물종 유래의 니트릴히드라타제(예를 들면, 로도코커스 로도크로우스 J-1주 유래의 니트릴히드라타제)를 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제의 입체 구조나 아미노산 서열과 얼라인먼트하고, 상기 아미노산 잔기에 상당하는 아미노산 잔기를 알아내어, 상당하는 아미노산 서열 중의 아미노산을 변경함에 의한 개변 방법도 본 발명에 포함된다.

<152> 이상에서 열거한 내용을 실시함에 있어서, 입체 구조 내지 아미노산 서열에 기초하는 얼라인먼트를 행할 때에, 그것에 이용하는 수단은 특별히 한정되지 않지만, 아미노산 서열의 얼라인먼트의 수단으로서는 히타치 소프트사(Hitachi Software Engineering Co., Ltd.) 제조의 DNASIS나 프리 소프트웨어의 CLUSTALW나 BLAST 등의 유전자 서열 해석 소프트웨어가, 아미노산 서열의 얼라인먼트에 기초하는 입체 구조의 모델링의 수단으로는 악셀리스 사(Accelrys, Inc.) 제조의 모델러(modeler)나 호몰로지(homology) 등의 단백질 입체 구조 예측 소프트웨어를 각각 예로서 들 수 있다.

<153> 일례를 들면, 로도코커스 로도크로우스 J-1주 유래의 니트릴히드라타제(서열목록의 서열번호 104・특허문헌 2・비특허문헌 1 참조)의 경우, 얼라인먼트의 결과, 서열목록의 서열번호 99 기재의 아미노산 서열 중의 48번째에 상당하는 아미노산 잔기: Leu에 상당하는 아미노산 잔기는 서열목록의 서열번호 104 기재의 염기 서열의 1번째 내지 690번째로 이루어지는 ORF가 코딩하는 아미노산 서열의 48번째에 상당하는 아미노산 잔기: Trp이고, 서열목록의 서열번호 99 기재의 아미노산 서열 중의 51번째에 상당하는 아미노산 잔기: Phe에 상당하는 아미노산 잔기는 서열목록의 서열번호 104 기재의 염기 서열의 1번째 내지 690번째로 이루어지는 ORF가 코딩하는 아미노산 서열의 51번째에 상당하는 아미노산 잔기: Ser이다. 이것은 아미노산 서열에 기초한 얼라인먼트와 입체 구조에 기초한 얼라인먼트에서 일치하는 결과이다. 상기 2개의 아미노산 잔기에 상당하는 아미노산 서열 중의 아미노산 중 어느 한쪽 또는 양쪽 모두를 변경하는 것에 의한 개변 방법도 본 발명에 포함된다.

<154> 또한, 이상의 개변 방법을 실시함에 있어서, 아미노산 잔기에 상당하는 아미노산 서열 중의 아미노산을 변경하기 위한 변이 도입 수단에 관해서는 특별히 한정되지 않지만, 유전자 재조합의 기법을 이용하여 아미노산 서열 중의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환하는 변이 도입법을 그 예로서 들 수 있다.

<155> 또한, 의도적으로 도입한 변이 이외에 부차적으로 도입되는 변이에 의한 아미노산 서열이나 염기 서열의 변화에 대해서는, 의도한 변이 도입에 의한 목적의 니트릴히드라타제 활성을 손상시키지 않는 범위 내에서, 아미노산이나 염기의 치환, 삽입 또는 삭제가 일어나도 된다.

<156> 이와 같은 부차적으로 도입되는 변이에 대해서는 이하와 같은 예를 들 수 있다. 어느 일정한 염기 서열을 가지는 유전자를 주형으로 하여 전사・번역된 경우에 있어서도, 그것을 도입하는 숙주 세포의 종류나 배양에 사용하는 영양 배지의 성분이나 조성 또는 배양시의 온도나 pH 등에 따라서는, 유전자 발현 후의 숙주 세포내 효소에 의한 수식 등에 의해, 초기의 효소 작용은 유지하지만, 서열목록에 있어서의 N 말단 부근의 아미노산의 1개 또는 2개 이상이 결실되거나, N 말단에 1개 또는 2개 이상의 아미노산이 새로이 부가된 이형체를 생산할 수 있다. 그 때문에, 그러한 이형인 니트릴히드라타제를 가져오는 개변 방법도 본 발명에 포함된다.

<157> 본 발명에 있어서의 개변 방법의 대상이 되는 개변 전의 니트릴히드라타제의 예로서는, 로도코커스 로도크로우스 J-1주 유래의 니트릴히드라타제와 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제를 들 수 있다. 구체적으로는, 서열목록의 서열번호 104 기재의 염기 서열의 1번째 내지 690번째로 이루어지는 ORF가 코딩하는 아미노산 서열과 상동인 아미노산 서열에 의해 형성되는 폴리펩티드 사슬과 서열목록의 서열번호 104 기재의 염기 서열의 704번째 내지 1315번째로 이루어지는 ORF가 코딩하는 아미노산 서열과 상동인 아미노산 서열에 의해 형성되는 폴리펩티드 사슬을 구성요소로 하는 니트릴히드라타제와, 서열목록의 서열번호 98 기재의 아미노산 서열에 의해 형성되는 폴리펩티드 사슬과 서열목록의 서열번호 99 기재의 아미노산 서열에 의해 형성되는 폴리펩티드 사슬을 구성요소로 하는 니트릴히드라타제를 들 수 있다.

<158> 본 발명에 있어서의 개변 방법의 대상이 되는 개변 전의 니트릴히드라타제에는, 서열목록의 서열번호 98 기재의 아미노산 서열과 40% 이상의 상동성을 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드와 서열목록의 서열번호 99 기재의 아미노산 서열과 25% 이상의 상동성을 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드를 구성요소로 하는 니트릴히드라타제도 포함된다.

<159> 서열목록의 서열번호 98 기재의 아미노산 서열과 40% 이상의 상동성을 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 폴

리펩티드의 예로서는, 서열목록의 서열번호 98 기재의 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드, 서열목록의 서열번호 98 기재의 아미노산 서열의 적어도 1개소에 관해서 치환, 삽입 또는 삭제 중 임의의 변경을 행한 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드, 서열목록의 서열번호 98 기재의 아미노산 서열의 6・19・38・77・90・102・106・126・130・142・146・187・194・203번째의 아미노산 중 적어도 1개의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환한 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드, 서열목록의 서열번호 104 기재의 염기 서열의 704번째 내지 1315번째로 이루어지는 ORF가 코딩하는 아미노산 서열과 상동인 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드 등을 들 수 있다.

<160> 또한, 서열목록의 서열번호 98 기재의 아미노산 서열과 40% 이상의 상동성을 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드는, 그 서열 중에 $X_1CXLC_1SC_2X_2X_3X_4X_5$(여기에서, C는 시스테인을, X는 세린 또는 트레오닌을, L은 류신을, C_1은 시스테인 술핀산(CYSTEINE SULFINIC ACID・3-SULFINOALANINE)을, S는 세린을, C_2는 시스테인 술펜산(CYSTEINE SULFENIC ACID・S-HYDROXY-CYSTEINE)을, X_1・X_2・X_3・X_4・X_5는 임의의 아미노산을 나타낸다.)로 표시되는 영역을 포함하는 폴리펩티드인 것을 특징으로 하는 경우가 있다. 게다가, X_1이 발린, X_4가 트립토판, X_5가 프롤린인 폴리펩티드인 것을 특징으로 하는 경우가 있다. 또한, X_2가 티로신, X_3가 프롤린인 폴리펩티드인 것을 특징으로 하는 경우가 있다.

<161> 상기의 경우, $X_1CXLC_1SC_2X_2X_3X_4X_5$로 표시되는 영역을 통해 금속 원자와 결합하고 있는 것을 특징으로 하는 경우가 있다. 게다가, 상기 금속이 코발트인 것을 특징으로 하는 경우가 있다.

<162> 서열목록의 서열번호 99 기재의 아미노산 서열과 25% 이상의 상동성을 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드의 예로서는, 서열목록의 서열번호 99 기재의 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드, 서열목록의 서열번호 99 기재의 아미노산 서열의 적어도 1개소에 관해서 치환, 삽입 또는 삭제 중 임의의 변경을 행한 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드, 서열목록의 서열번호 99 기재의 아미노산 서열의 20・21・108・200・212번째의 아미노산 중 적어도 1개의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환한 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드, 서열목록의 서열번호 104 기재의 염기 서열의 1번째 내지 690번째로 이루어지는 ORF가 코딩하는 아미노산 서열과 상동인 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드 등을 들 수 있다.

<163> 일례를 들면, 로도코커스 로도크로우스 J-1주 유래의 니트릴히드라타제의 경우, 서열목록의 서열번호 104 기재의 염기 서열의 704번째 내지 1315번째로 이루어지는 ORF가 코딩하는 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드와 서열목록의 서열번호 104 기재의 염기 서열의 1번째 내지 690번째로 이루어지는 ORF가 코딩하는 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드를 구성요소로 하는 니트릴히드라타제이므로, 본 발명에 있어서의 개변 방법의 대상이 되는, 개변 전의 니트릴히드라타제에 포함된다.

<164> 또한, 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제는, 서열목록의 서열번호 98 기재의 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드와 서열목록의 서열번호 99 기재의 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드를 구성요소로 하는 니트릴히드라타제이므로, 본 발명에 있어서의 개변 방법의 대상이 되는, 개변 전의 니트릴히드라타제에 포함된다.

<165> 또한, 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제로부터 파생한 니트릴히드라타제의 예로서, 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제의 구성요소 중, 서열목록의 서열번호 98 기재의 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드가 서열목록의 서열번호 98 기재의 아미노산 서열의 적어도 1개소에 관해서 치환, 삽입 또는 삭제 중 임의의 변경을 행한 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드, 또는 서열목록의 서열번호 98 기재의 아미노산 서열의 6・19・38・77・90・102・106・126・130・142・146・187・194・203번째의아미노산 중 적어도 1개의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환한 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드로 치환한 니트릴히드라타제인 것, 및 서열목록의 서열번호 99 기재의 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드가 서열목록의 서열번호 99 기재의 아미노산 서열의 적어도 1개소에 관해서 치환, 삽입 또는 삭제 중 임의의 변경을 행한 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드, 또는 서열목록의 서열번호 99 기재의 아미노산 서열의 20・21・108・200・212번째의 아미노산 중 적어도 1개의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환한 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드로 치환한 니트릴히드라타제인 것 중, 어느 한쪽 또는 양쪽의 조건을 만족시키는 니트릴히드라타제를 들 수 있다,

<166> 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제로부터 파생한 니트릴히드라타제도, 본 발명에 있어서의 개변 방법의 대상이 되는 개변 전의 니트릴히드라타제에 포함된다.

<167> 본 발명에 있어서, 개변 효소란 니트릴히드라타제 활성을 가지는 효소를 대상으로 하여 개변 방법을 실시함으로써 얻어지는 니트릴히드라타제를 말한다. 그 예로서는, 상술한 개변 방법을 이용하여 개변 전의 니트릴히드라타제의 형질을 변화시켜 얻어지는 것을 특징으로 하는 개변 효소를 그 예로서 들 수 있다.

<168> 형질의 변화로서는, 개변 전의 니트릴히드라타제와 비교한 경우, 기질 특이성·Vmax·Km·열안정성·기질(: 상기 효소가 촉매로서 기능하여, 대응하는 아미드 화합물로 변환하는 것이 가능한 임의의 니트릴 화합물을 예로 들 수 있다.)에 대한 안정성·생성물(: 상기 효소가 촉매로서 기능하여, 임의의 니트릴 화합물을 변환함으로써 얻어지는 대응하는 아미드 화합물을 예로 들 수 있다.)에 대한 안정성 등의 성질들 중 어느 하나 이상의 성질에 관한 변화를 들 수 있다. 구체적인 예로서는, 다음의 것 등을 들 수 있다.

<169> 1) 상대적으로, 보다 벌크성(bulkiness)이 큰 니트릴 화합물을 기질로 하기가 용이해진다.

<170> 2) 상대적으로, 보다 벌크성이 작은 니트릴 화합물을 기질로 하기가 용이해진다.

<171> 3) 임의의 니트릴 화합물을 기질로 하는 경우의 Vmax가 향상한다.

<172> 4) 임의의 니트릴 화합물을 기질로 하는 경우의 Km가 경감한다.

<173> 5) 효소를 임의의 열량에 노출한 경우의 불가역적 실활률(失活率)이 경감한다.

<174> 6) 효소를 임의 농도의 기질에 노출한 경우의 불가역적 실활률이 경감한다.

<175> 7) 반응 중에 임의 농도의 생성물이 존재하는 것에 의한 반응 저해율이 경감한다.

<176> 8) 효소를 임의 농도의 생성물에 노출한 경우의 불가역적 실활률이 경감한다.

<177> 본 발명에 있어서의 개변 전의 니트릴히드라타제를 대상으로 한 개변 방법이 가져오는 형질 변화의 지표로서는 기질 특이성의 변화를 그 대표예의 하나로 들 수 있다. 본 발명에 있어서의 개변 방법에 의해 얻어지는 개변 효소가 기질 특이성이 변화한 것인 경우, 그 개변 효소는 본 발명에 있어서의 개변 효소에 포함된다.

<178> 얻어지는 개변 효소의 기질 특이성의 변화를 관찰하는 방법으로서는, 벌크성이 상이한 다수 종의 니트릴 화합물을 기질로 하는 반응을 행하여, 생성되는 대응 아미드 화합물 양의 차이를 측정하는 방법을 들 수 있다. 그의 일례로서는 아크릴로니트릴을 기질로 하는 반응에서 생성되는 아크릴아미드와, 메타크릴로니트릴을 기질로 하는 반응에서 생성되는 메타크릴아미드의 몰 비를 비교하는 방법이 있다. 이 경우, 개변 전의 대상과 비교하여 [생성되는 메타크릴아미드의 몰량] ÷ [생성되는 아크릴아미드의 몰량]의 값이 커지는 방향으로 변화된 개변 효소는, 보다 벌크성이 큰 니트릴 화합물을 기질로 하기가 용이해지는 형질의 변화를 나타냈다고 할 수 있고, 그 값이 작아지는 방향으로 변화된 개변 효소는 보다 벌크성이 작은 니트릴 화합물을 기질로 하기가 용이해지는 형질의 변화를 나타냈다고 할 수 있다.

<179> 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제, 및 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제로부터 파생한 니트릴히드라타제를 대상으로 한 예에 있어서는, 입체 구조의 해석에 의해, 기질이 효소 외부로부터 활성 중심으로 향할 때에나 생성물이 활성 중심으로부터 효소 외부로 향할 때에 통과하는 공동을 형성하는 영역, 및/또는 2량체 형성에 관여하는 α-서브유닛과 β-서브유닛 사이의 회합 계면이나 2량체끼리의 회합에 관여하는 계면을 형성하는 영역을 특정하여, 상기 영역에 존재하는 아미노산 잔기에 상당하는 아미노산 서열 중의 아미노산의 어느 1개소 이상에 치환, 삽입 또는 삭제 등의 변경을 가하는 공정을 포함하는 개변 방법을 실시한 경우, 개변 전의 대상과 비교하여, 아크릴로니트릴을 기질로 하는 반응에서 생성되는 아크릴아미드와 메타크릴로니트릴을 기질로 하는 반응에서 생성되는 메타크릴아미드의 몰 비가 변화된 개변 효소가 얻어졌다. 이것은 기질 특이성, 즉 형질이 변화한 것이라고 할 수 있으므로, 얻어진 개변 효소는 본 발명에 있어서의 개변 효소에 포함된다.

<180> 로도코커스 로도크로우스 J-1주 유래의 니트릴히드라타제를 대상으로 한 예에 있어서는, 서열목록의 서열번호 104 기재의 염기 서열의 1번째 내지 690번째로 이루어지는 ORF가 코딩하는 아미노산 서열의 48번째에 상당하는 아미노산 잔기: Trp를 다른 아미노산 잔기로 변경함에 의한 개변 방법을 실시한 경우, 개변 전의 대상과 비교하여, 보다 벌크성이 큰 니트릴 화합물을 기질로 하기가 용이해지는 형질의 변화를 나타냈다. 따라서, 획득한 형질 변화를 나타내는 단백질은 본 발명에 있어서의 개변 효소에 포함된다.

<181> 또한, 얻어지는 개변 효소가 가지는 변이 부위를 조합함으로써, 추가의 형질의 변화가 초래되는 것은 용이하게 유추된다. 따라서, 그와 같은 변이 부위의 조합에 의해 얻어지는 개변 효소도 본 발명에 있어서의 개변 효소에

포함된다.

<182> 본 발명에 있어서, 개변 효소를 코딩하는 유전자란 개변 효소를 구성하는 2종의 폴리펩티드 사슬을 형성하는 것을 특징으로 하는 2개의 아미노산 서열 내지 그것들을 코딩하는 것을 특징으로 하는 2개의 ORF를 이루는 염기 서열을 가리킨다.

<183> 본 발명에 있어서, 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 플라스미드란, 개변 효소를 구성하는 2종의 폴리펩티드 사슬을 형성하는 것을 특징으로 하는 2개의 아미노산 서열을 코딩하는 것을 특징으로 하는 2개의 ORF를 이루는 염기 서열을 그 서열 중에 함유하는 것을 특징으로 하는 플라스미드를 가리킨다.

<184> 상기 플라스미드는 본 발명에 있어서의 유전자에 부가하여, 각 유전자의 발현에 필요한 제어 영역 및 자율 복제에 필요한 영역 등의 임의의 숙주 세포를 형질전환하여 얻어지는 형질전환체나 세포주에 의한 개변 효소의 생산을 가능하게 하는 구성을 가질 수 있다. 여기서 말하는 임의의 숙주 세포란, 후술하는 실시예와 같이 그의 일례로서 대장균을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 고초균 등의 바실러스속균, 효모나 방선균 등의 다른 미생물도 이용할 수 있다.

<185> 발현에 필요한 제어 영역으로서는, 프로모터 서열(전사를 제어하는 오퍼레이터 서열을 포함한다.), 리보솜 결합 서열(SD 서열), 전사 종결 서열 등을 들 수 있다.

<186> 구체적인 프로모터 서열의 예로서는, 대장균 유래의 트립토판 오페론의 trp 프로모터·락토스 오페론의 lac 프로모터·람다 파지 유래의 PL 프로모터 및 PR 프로모터나, 고초균 유래의 글루콘산 합성효소 프로모터(gnt), 알칼리 프로테아제 프로모터(apr), 중성 프로테아제 프로모터(npr), α-아밀라제 프로모터(amy) 등을 들 수 있다. 또한, tac 프로모터나 trc 프로모터와 같이 인위적으로 설계·개량된 서열도 이용할 수 있다.

<187> 리보솜 결합 서열로서는, 대장균 유래나 고초균 유래 또는 로도코커스나 슈도노카르디아 본래의 서열을 들 수 있지만, 대장균이나 고초균 등의 원하는 숙주 세포 내에서 기능하는 서열이면 특별히 한정되지 않는다. 예를 들면, 16S 리보솜 RNA의 3' 말단 영역에 상보적인 서열이 4 염기 이상 연속한 컨센서스(consensus) 서열을 DNA 합성에 의해 작성하여 이것을 이용해도 된다. 전사 종결 서열은 반드시 필요하지는 않지만, ρ 인자 비의존성인 것, 예를 들면 리포프로테인 터미네이터·trp 오페론 터미네이터 등을 이용할 수 있다. 이들 제어 영역의 플라스미드 상에서의 서열 순서는, 프로모터 서열과 리보솜 결합 서열이 본 발명에 있어서의 유전자보다 5' 말단측 상류에 위치하는 것이 바람직하고, 전사 종결 서열이 본 발명에 있어서의 유전자보다 3' 말단측 하류에 위치하는 것이 바람직하다. 또한, 그와 같은 제어 영역에 의해 본 발명에 있어서의 유전자를 구성하는 각각의 ORF를 코딩하는 염기 서열이 각각 독립의 시스트론으로서 발현되어도 되고, 공통의 제어 영역에 의해 폴리시스트론으로서 발현되어도 된다.

<188> 이상의 요건을 충족하고 있는 플라스미드 벡터의 예로서는, 대장균 중에서의 자율 복제가능한 영역을 가지고 있는 pBR322, pUC18, pBluescript, pKK223-3, pSC101이나, 고초균 중에서의 자율복제가능한 영역을 가지고 있는 pUB110, pTZ4, pC194, ρ11, φ1, φ105 등을 들 수 있다. 또한, 2종류 이상의 숙주 세포 내에서의 자율복제가 가능한 플라스미드 벡터의 예로서, pHV14, TRp7, YEp7, pBS7를 들 수 있다.

<189> 본 발명에 있어서의 유전자를 발현시켜 원하는 활성을 가지는 니트릴히드라타제를 생산할 때에는, 니트릴히드라타제의 활성화에 관여하는 단백질이 필요하게 되는 경우가 있다.

<190> 니트릴히드라타제의 활성화에 관여하는 단백질이란, 상기 단백질의 발현의 유무가 니트릴히드라타제의 활성화를 직접 좌우하는 성질을 가지고 있는 단백질로, 특허문헌 4 기재의 슈도노카르디아 서모필라 유래의 니트릴히드라타제 활성화에 관여하는 단백질(니트릴히드라타제 활성화 단백질)을 그 예로서 들 수 있다. 구체적으로는, 니트릴히드라타제 활성화 단백질로서는, 서열번호 102의 아미노산 서열로 표시되는 144개의 아미노산의 서열로 구성되는 것을 그 예로서 들 수 있다. 또한, 서열번호 102의 아미노산 서열의 일부에서의 아미노산의 치환, 삽입 또는 삭제 등에 의해 얻어진 이형 단백질도 니트릴히드라타제의 활성화에 관여하는 것이면, 니트릴히드라타제 활성화 단백질에 포함되는 것으로 한다. 상기 이형 단백질로서는, 서열번호 102의 아미노산 서열에 있어서 1개 이상의 아미노산의 치환, 삽입 또는 삭제 등에 의한 변이를 가지며, 니트릴히드라타제의 활성화에 관여하는 성질을 유지하고 있는 것을 들 수 있다.

<191> 니트릴히드라타제 활성화 단백질을 코딩하는 유전자로서는, 니트릴히드라타제 활성화 단백질을 코딩하는 유전자이면 특별히 한정되지 않는다. 상기 유전자로서는, 상기 서열번호 102의 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열을 가지는 유전자 및 상기 이형 단백질을 코딩하는 유전자를 들 수 있다. 또한, 상기 니트릴히드라타제 활성화 단백질을 코딩하는 유전자의 바람직한 예로서는, 서열번호 103의 염기 서열을 가지는 유전자를 들 수 있다. 또한,

니트릴히드라타제 활성화 단백질을 코딩하는 유전자로는, 서열번호 103에 기재된 염기 서열 중 1개 또는 2개 이상에 관해서 염기의 치환·삽입·삭제를 행한 서열이어도, 그것이 니트릴히드라타제 활성화 단백질을 코딩하는 유전자로서 기능하는 경우에는, 니트릴히드라타제 활성화 단백질을 코딩하는 유전자의 범위에 포함되는 것으로 한다.

<192> 니트릴히드라타제 활성화 단백질을 코딩하는 유전자를 이용하는 경우로서는, 그의 ORF를 본 발명에 있어서의 유전자를 이루는 2개의 ORF와 함께, 본 발명에 있어서의 플라스미드 중에 포함하는 예를 들 수 있다. 그 경우, 이들 ORF의 플라스미드 상에 있어서의 순서는 특별히 한정되지 않고, 또한 3개의 ORF가 동일한 제어 영역에 의해 제어되어도 되고, 2개의 ORF가 동일한 제어 영역에 의해 제어되고 나머지 1개의 ORF가 다른 2개와는 다른 제어 영역에 의해 제어되어도 좋으며, 3개의 ORF가 각각 다른 제어 영역에 의해 제어되어도 좋다.

<193> 그러한 벡터 플라스미드에 본 발명에 있어서의 유전자를 본 발명에 있어서의 개변 효소의 활성 발현에 필요한 영역과 함께 삽입하여 본 발명의 플라스미드를 구축하는 방법이나 상기 플라스미드를 원하는 숙주 세포에 형질전환하는 방법 및 형질전환체 내에서 니트릴히드라타제를 생산하는 방법에는, 예를 들면 「Molecular Cloning 제 3 판」(J. Sambrook 등; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001) 등에 기재되어 있는 분자생물학·생물 공학·유전자 공학의 분야에 있어서 공지된 일반적인 방법과 숙주 세포를 이용할 수 있다.

<194> 본 발명에 있어서, 형질전환에 의해 얻어지는 것을 특징으로 하는 형질전환체로서는 본 발명에 있어서의 유전자 내지 플라스미드를 이용하여 숙주 세포를 형질전환하여 얻어진 것을 포함한다. 상기 형질전환체를 배양하는 예로서는, 배양용 배지에 심은 후, 적당한 배양 온도(일반적으로는, 20℃~50℃)에서 생육시키는 것을 특징으로 하는 방법을 들 수 있다.

<195> 또한, 숙주 세포가 미생물인 경우, 상기 형질전환체를 배양하는 배지로서 LB 배지나 M9 배지 등이 일반적으로 이용되지만, 그러한 배지 성분에 금속 이온을 첨가해도 된다. 첨가하는 금속 이온으로서는 Fe 이온 및 Co 이온을 들 수 있다. 또한, 첨가량으로서는 0.1㎍/㎖ 이상의 첨가를 예로서 들 수 있다.

<196> 본 발명에 있어서, 형질전환체를 배양하여 얻어지는 배양액, 세포, 또는 그것들의 처리물로부터 개변 효소를 회수하는 공정을 포함하는 것을 특징으로 하는 개변 효소의 조제 방법으로서는, 상기 형질전환체, 상기 형질전환체의 배양액, 또는 상기 형질전환체나 상기 배양액의 처리물로부터 니트릴히드라타제 활성을 회수하는 공정을 가지는 특징이 있는 예를 들 수 있다.

<197> 본 발명에 있어서, 니트릴 화합물을 대응하는 아미드 화합물로 전화시키는 공정을 포함하는 것을 특징으로 하는 아미드 화합물 제조 방법으로서는, 상기 형질전환체, 상기 형질전환체의 배양액, 또는 상기 형질전환체나 상기 배양액의 처리물, 또는 상기 조제 방법에 의해 회수한 니트릴히드라타제 활성을 촉매로서 이용하여, 니트릴 화합물을 대응하는 아미드 화합물로 변환하는 공정을 가지는 특징이 있는 예를 들 수 있다.

<198> 본 발명에 있어서의 개변 효소 또는 상기 효소 활성을 가지는 형질전환체를 이용하여, 니트릴 화합물로부터 대응하는 아미드 화합물을 제조하는 예로서는, 원하는 니트릴 화합물을, 상기 효소 정제물이나 조(粗)효소조제물, 본 발명에 있어서의 형질전환체의 배양액, 배양액으로부터 얻어지는 형질전환체, 또는 형질전환체의 처리물과 용매 중에서 접촉시키는 공정을 포함하는 방법을 들 수 있다. 여기서 말하는 처리물이란, 상기 형질전환체로부터의 추출물이나 분쇄물, 이들 추출물이나 분쇄물의 니트릴히드라타제 활성 분획을 분리하여 얻어지는 조(粗)효소조제물, 또한 정제하여 얻어지는 효소 정제물 등의 후분리물, 상기 형질전환체나 상기 형질전환체의 추출물, 분쇄물 또는 후 분리물을 적당한 수단을 이용하여 고정화한 고정화물을 포함한다. 접촉시키는 온도는 특별히 한정되지 않지만, 바람직하게는 상기 니트릴히드라타제가 실활하지 않는 온도 범위 내이며, 보다 바람직하게는 빙점 이상 60℃ 이하이다.

<199> 니트릴 화합물로서는, 본 발명의 개량 효소가 기질로서 작용할 수 있는 화합물이면 특별히 한정되지 않지만, 아세토니트릴·프로피오니트릴·아크릴로니트릴·메타크릴로니트릴·n-부티로니트릴·이소부티로니트릴·크로토노니트릴·α-히드록시이소부티로니트릴등의 탄소수 2~4의 니트릴 화합물을 그 예로서 들 수 있다. 상기 니트릴 화합물의 용매 중에서의 농도는 특별히 한정되는 것은 아니고, 또한 반응 온도도 특별히 한정되지 않지만, 바람직하게는 상기 니트릴히드라타제가 실활하지 않는 온도 범위 내이며, 보다 바람직하게는 빙점이상 50℃ 이하이다.

<200> 이하에 기재하는 실시예에 의해 본 발명을 더욱 상세하게 설명하지만, 본 발명은 이하의 실시예에 의해 하등 한정되지 않는다. 또한, 각 실시예 및 비교예에 있어서의 HPLC 분석은, 컬럼으로서 일본 분광(JASCO Corporation) 제조의 Finepak SIL C18-5(250 × 4.6Φmm)를 이용하여, 4부피%의 아세토니트릴을 함유하는 10mM 인산 수용액을

전개액으로서 사용하였다. 또한, 아크릴아미드, 아크릴로니트릴·아크릴산·메타크릴아미드·메타크릴로니트릴·메타크릴산은 210nm의 흡광도에 의해 검출하였다.

<201> [참고예 1] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(1)

<202> α-서브유닛의 6번째의 Leu를 Met로 치환하기 위해, 타카라 주조사 제조의 「LA PCR in vitro mutagenesis Kit」를 이용한 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다. 이후, 「LA PCR in vitro mutagenesis Kit」를 간단히 키트라고 칭한다. 이하의 참고예에서는 기본적으로 키트의 원리 및 조작 방법을 답습하였다.

<203> 30mL의 시험관에 10mL의 LB 액체 배지를 조제하여, 121℃·20분간 오토클레이브에 의해 멸균하였다. 상기 배지에 최종 농도가 100㎍/㎖가 되도록 암피실린을 첨가한 후, MT-10822를 1백금이(one platinum loop) 접종하여, 37℃·300rpm으로 약 20시간 배양하였다. 상기 배양액 1mL를 적당한 원심 튜브에 분취한 후, 원심분리(15000rpm × 5분)에 의해 균체를 분리하였다. 이어서, 알칼리 SDS 추출법에 의해 상기 균체로부터 플라스미드 pPT-DB1을 조제하였다.

<204> 각각 10ng의 pPT-DB1을 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 7 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 마이크로콘 100(Microcon100, 타카라 주조사 제조)을 이용하여 각각의 PCR 반응 종료액으로부터 과잉의 프라이머 및 dNTP를 제거한 후, TE를 가해 각각 50㎕의 용액을 조제하였다. 이 TE 용액을 각 0.5㎕씩 함유하는 전체량 47.5㎕의 어닐링 용액(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)을 조제하여, 열변성 처리(98℃)를 10분간 행한 후, 37℃까지 60분간에 걸쳐 일정한 속도로 냉각을 행하고, 이어서 37℃에서 15분간 유지함으로써 어닐링 처리를 행하였다. 어닐링 처리액에 TaKaRa LA Taq를 0.5㎕ 가해 72℃에서 3분간 가열 처리를 행하여, 헤테로 2본쇄를 완성시켰다. 이것에 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 가해 전체량을 50㎕로 한 후, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복하는 것에 의한 PCR 반응 No. 3을 행하였다. PCR 반응 No. 3의 반응 종료액 5㎕를 이용한 아가로스 겔 전기영동(시그마사 제조, 타입 VII 저융점 아가로스 사용; 아가로스 농도 0.8중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 약 2kbp의 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이어서, 아가로스 겔로부터 약 2kbp의 DNA 단편만을 잘라내어, 이 아가로스편(약 0.1g)을 미세하게 분쇄하여 1mL의 TE 용액에 현탁한 후, 55℃에서 1시간 보온하여 아가로스를 완전하게 융해시켰다. 이 융해액에 대해서 페놀/클로로포름 추출과 에탄올 침전을 행하여 상기 DNA 단편을 정제하여, 최종적으로 10㎕의 TE에 용해시켰다. 정제한 약 2kbp의 증폭 DNA 단편을 제한효소 EcoRI 및 HindIII에 의해 절단한 후, 이 제한효소 처리액에 대해서 페놀/클로로포름 추출과 에탄올 침전을 행하여 상기 DNA 단편을 정제하여, 최종적으로 10㎕의 TE에 용해시켰다. 마찬가지로, EcoRI 및 HindIII에 의해 pPT-DB1을 절단하여, 아가로스 겔 전기영동(시그마사 제조, 타입 VII 저융점 아가로스 사용; 아가로스 농도 0.7%)을 행하여, 아가로스 겔로부터 약 2.7kbp의 DNA 단편만을 잘라내었다. 잘라낸 아가로스편(약 0.1g)을 미세하게 분쇄하여 1mL의 TE 용액에 현탁한 후, 55℃에서 1시간 보온하여 아가로스를 완전하게 융해시켰다. 이 융해액에 대해서 페놀/클로로포름 추출과 에탄올 침전을 행하여 상기 DNA 단편을 정제하여, 최종적으로 10㎕의 TE에 용해시켰다. 이와 같이 하여 얻어진 약 2kbp와 약 2.7kbp의 DNA 단편을 DNA 라이게이션 키트(타카라 주조사 제조)를 이용하여 연결시킨 후, 대장균 HB101의 컴피턴트 세포(토요 방적사 제조)를 형질전환하여, 형질전환체 No. 1을 얻었다.

<205> 얻어진 형질전환체를 이용한 아미드 화합물의 제조에 있어서의 전화율 및 선택률을 이하의 방법에 의해 구하였다.

<206> 500mL의 배플 부착형 삼각 플라스크에 40㎍/㎖의 황산제이철·칠수화물 및 10㎍/㎖의 염화코발트·이수화물을 함유하는 100mL의 LB 액체 배지를 조제하여, 121℃·20분간 오토클레이브에 의해 멸균하였다. 상기 배지에 최종 농도가 100㎍/㎖가 되도록 암피실린을 첨가한 후, 형질전환체 No. 1을 1백금이 접종하여, 37℃·130rpm으로 약 20시간 배양하였다. 상기 배양 종료액으로부터 원심분리(5000G × 15분)에 의해 균체를 분리하였다. 이어서, 분리한 상기 균체를 50mL의 생리 식염수에 재현탁한 후에, 한번 더 원심분리(5000G × 15분)에 의해 균체를 분리

하였다. 상기 균체 0.1g을 20mL의 50mM 인산칼륨 수용액(pH7.0)에 현탁시켜, 이것에 1mL의 아크릴로니트릴 또는 메타크릴로니트릴을 첨가하여 10℃에서 서서히 교반하면서 1시간 반응시켰다. 반응 종료후, HPLC를 이용하여 반응액의 분석을 행한 결과, 반응액 중에는 첨가한 니트릴 화합물(아크릴로니트릴 또는 메타크릴로니트릴)에 상당하는 몰량의 아미드 화합물(아크릴아미드 또는 메타크릴아미드)만이 존재하고, 니트릴 화합물(아크릴로니트릴 또는 메타크릴로니트릴) 및 대응하는 유기산(아크릴산 또는 메타크릴산)의 존재는 확인되지 않았다. 즉, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<207> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법(dideoxy method)에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 1에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 6번째의 Leu가 Met로 치환되어 있었다.

표 1

<208>

클론 번호	변이 개소 (α-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 1	α-6번째	Leu	Met	CTG	ATG

<209> [참고예 2] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(2)

<210> α-서브유닛의 6번째의 Leu를 Thr로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 참고예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<211> 참고예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 11 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, PCR 반응 No. 2를 포함하는 참고예 1에 있어서의 조작과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 2를 얻었다.

<212> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 100%였다.

<213> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 2에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 6번째의 Leu가 Thr로 치환되어 있었다.

표 2

<214>

클론 번호	변이 개소 (α-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 2	α-6번째	Leu	Thr	CTG	ACG

<215> [참고예 3] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(3)

<216> α-서브유닛의 6번째의 Leu를 Ala로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 참고예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<217> 참고예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 12 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서

열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 참고예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 3을 얻었다.

<218> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<219> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 3에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 6번째의 Leu가 Ala로 치환되어 있었다.

표 3

<220>

클론 번호	변이 개소 (α-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 3	α-6번째	Leu	Ala	CTG	GCG

<221> [참고예 4] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(4)

<222> α-서브유닛의 6번째의 Leu를 Val로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 참고예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<223> 참고예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 13 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 참고예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 4를 얻었다.

<224> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<225> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 4에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 6번째의 Leu가 Val로 치환되어 있었다.

표 4

<226>

클론 번호	변이 개소 (α-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 4	α-6번째	Leu	Val	CTG	GTG

<227> [참고예 5] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(5)

<228> α-서브유닛의 19번째의 Ala를 Val로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 참고예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<229> 참고예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 14 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기

영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 참고예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 5를 얻었다.

<230> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<231> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 5에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 19번째의 Ala가 Val로 치환되어 있었다.

표 5

<232>

클론 번호	변이 개소 (α-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 5	α-19번째	Ala	Val	GCG	GTG

<233> [참고예 6] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(6)

<234> α-서브유닛의 38번째의 Met를 Leu로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 참고예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<235> 참고예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 15 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50μL의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 참고예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 6을 얻었다.

<236> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<237> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 6에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 38번째의 Met가 Leu로 치환되어 있었다.

표 6

<238>

클론 번호	변이 개소 (α-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 6	α-38번째	Met	Leu	ATG	TTG

<239> [참고예 7] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(7)

<240> α-서브유닛의 77번째의 Thr를 Ser로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 참고예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<241> 참고예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 16 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 참고예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 7을 얻었다.

<242> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<243> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 7에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 77번째의 Thr이 Ser로 치환되어 있었다.

표 7

<244>

클론 번호	변이 개소 (α-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 7	α-77번째	Thr	Ser	ACC	TCC

<245> [참고예 8] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(8)

<246> α-서브유닛의 90번째의 Gly를 Ala로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 참고예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<247> 참고예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 17 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 참고예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 8을 얻었다.

<248> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<249> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 8에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 90번째의 Gly가 Ala로 치환되어 있었다.

표 8

<250>

클론 번호	변이 개소 (α-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 8	α-90번째	Gly	Ala	GGC	GCC

<251> [참고예 9] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(9)

<252> α-서브유닛의 102번째의 Val를 Ala로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 참고예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<253> 참고예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 18 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 참고예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 9를 얻었다.

<254> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<255> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트

와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 9에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 102번째의 Val이 Ala로 치환되어 있었다.

표 9

<256>

클론 번호	변이 개소 (α-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 9	α-102번째	Val	Ala	GTC	GCC

<257> [참고예 10] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(10)

<258> α-서브유닛의 106번째의 Val를 Ile로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 참고예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<259> 참고예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 19 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 참고예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 10을 얻었다.

<260> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<261> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 10에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 106번째의 Val이 Ile로 치환되어 있었다.

표 10

<262>

클론 번호	변이 개소 (α-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 10	α-106번째	Val	Ile	GTC	ATC

<263> [참고예 11] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(11)

<264> α-서브유닛의 126번째의 Phe를 Tyr로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 참고예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<265> 참고예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 20 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 참고예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 11을 얻었다.

<266> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<267> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트

와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 11에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 126번째의 Phe가 Tyr로 치환되어 있었다.

표 11

<268>

클론 번호	변이 개소 (α-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 11	α-126번째	Phe	Tyr	TTC	TAC

<269> [참고예 12] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(12)

<270> α-서브유닛의 130번째의 Gln를 Glu로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 참고예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<271> 참고예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 21 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 참고예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 12를 얻었다.

<272> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<273> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 12에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 130번째의 Gln가 Glu로 치환되어 있었다.

표 12

<274>

클론 번호	변이 개소 (α-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 12	α-130번째	Gln	Glu	CAG	GAG

<275> [참고예 13] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(13)

<276> α-서브유닛의 142번째의 Leu를 Val로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 참고예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<277> 참고예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 22 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 참고예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 13을 얻었다.

<278> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<279> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트

와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 13에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 142번째의 Leu가 Val로 치환되어 있었다.

표 13

<280>

클론 번호	변이 개소 (α-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 13	α-142번째	Leu	Val	CTG	GTG

<281> [참고예 14] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(14)

<282> α-서브유닛의 146번째의 Glu를 Asp로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 참고예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<283> 참고예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 23 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 참고예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 14를 얻었다.

<284> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<285> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 14에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 146번째의 Glu가 Asp로 치환되어 있었다.

표 14

<286>

클론 번호	변이 개소 (α-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 14	α-146번째	Glu	Asp	GAG	GAC

<287> [참고예 15] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(15)

<288> α-서브유닛의 187번째의 Ala를 Thr로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 참고예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<289> 참고예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 24 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 참고예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 15를 얻었다.

<290> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<291> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트

와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 15에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 187번째의 Ala가 Thr로 치환되어 있었다.

표 15

<292>

클론 번호	변이 개소 (α-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 15	α-187번째	Ala	Thr	GCC	ACC

<293> [참고예 16] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(16)

<294> α-서브유닛의 194번째의 Ser를 Leu로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 참고예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<295> 참고예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 25 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 참고예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 16을 얻었다.

<296> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<297> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 16에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 194번째의 Ser가 Leu로 치환되어 있었다.

표 16

<298>

클론 번호	변이 개소 (α-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 16	α-194번째	Ser	Leu	TCG	TTG

<299> [참고예 17] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(17)

<300> α-서브유닛의 203번째의 Ala를 Glu로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 참고예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<301> 참고예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 26 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 참고예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 17을 얻었다.

<302> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<303> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트

와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 17에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 203번째의 Ala가 Glu로 치환되어 있었다.

표 17

<304>

클론 번호	변이 개소 (α-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 17	α-203번째	Ala	Glu	GCG	GAG

<305> [참고예 18] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(18)

<306> β-서브유닛의 20번째의 Ala를 Val로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 참고예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<307> 참고예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 27 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 참고예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 18을 얻었다.

<308> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<309> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 18에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 20번째의 Ala가 Val로 변환되고 있었다.

표 18

<310>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 18	β-20번째	Ala	Val	GCG	GTG

<311> [참고예 19] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(19)

<312> β-서브유닛의 21번째의 Asp를 Asn로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 참고예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<313> 참고예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 28 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 참고예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 19를 얻었다.

<314> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<315> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트

와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 19에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛 21번째의 Asp가 Asn로 치환되어 있었다.

표 19

<316>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 19	β-21번째	Asp	Asn	GAC	AAC

<317> [참고예 20] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(20)

<318> β-서브유닛의 108번째의 Glu를 Asp로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 참고예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<319> 참고예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 29 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 참고예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 20을 얻었다.

<320> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<321> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 20에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 108번째의 Glu가 Asp로 치환되어 있었다.

표 20

<322>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 20	β-108번째	Glu	Asp	GAG	GAT

<323> [참고예 21] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(21)

<324> β-서브유닛의 108번째의 Glu를 Pro로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 참고예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<325> 참고예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 30 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 참고예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 21을 얻었다.

<326> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<327> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그

결과, 표 21에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 108번째의 Glu가 Pro로 치환되어 있었다.

표 21

<328>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 21	β-108번째	Glu	Pro	GAG	CCG

<329> [참고예 22] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(22)

<330> β-서브유닛의 108번째의 Glu를 Ser로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 참고예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<331> 참고예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 31 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 참고예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 22를 얻었다.

<332> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<333> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 22에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 108번째의 Glu가 Ser로 치환되어 있었다.

표 22

<334>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 22	β-108번째	Glu	Ser	GAG	TCG

<335> [참고예 23] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(23)

<336> β-서브유닛의 108번째의 Glu를 Arg로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 참고예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<337> 참고예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 32 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 참고예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 23을 얻었다.

<338> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<339> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그

결과, 표 23에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 108번째의 Glu가 Arg로 치환되어 있었다.

표 23

<340>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 23	β-108번째	Glu	Arg	GAG	CGG

<341> [참고예 24] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(24)

<342> β-서브유닛의 108번째의 Glu를 Cys로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 참고예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<343> 참고예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 33 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 참고예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 24를 얻었다.

<344> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<345> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 24에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 108번째의 Glu가 Cys로 치환되어 있었다.

표 24

<346>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 24	β-108번째	Glu	Cys	GAG	TGC

<347> [참고예 25] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(25)

<348> β-서브유닛의 108번째의 Glu를 Leu로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 참고예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<349> 참고예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 34 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 참고예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 25를 얻었다.

<350> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<351> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그

결과, 표 25에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 108번째의 Glu가 Leu로 치환되어 있었다.

표 25

<352>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 25	β-108번째	Glu	Leu	GAG	CTG

<353> [참고예 26] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(26)

<354> β-서브유닛의 108번째의 Glu를 Thr로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 참고예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<355> 참고예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 35 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 참고예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 26을 얻었다.

<356> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<357> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 26에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 108번째의 Glu가 Thr로 치환되어 있었다.

표 26

<358>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 26	β-108번째	Glu	Thr	GAG	ACG

<359> [참고예 27] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(27)

<360> β-서브유닛의 200번째의 Ala를 Asp로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 참고예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<361> 참고예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 36 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 참고예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 27을 얻었다.

<362> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<363> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그

결과, 표 27에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 200번째의 Ala가 Asp로 치환되어 있었다.

표 27

<364>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 27	β-200번째	Ala	Asp	GCC	GAC

<365> [참고예 28] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(28)

<366> β-서브유닛의 200번째의 Ala를 Ile로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 참고예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<367> 참고예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 37 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 참고예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 28을 얻었다.

<368> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<369> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 28에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 200번째의 Ala가 Ile로 치환되어 있었다.

표 28

<370>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 28	β-200번째	Ala	Ile	GCC	ATC

<371> [참고예 29] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(29)

<372> β-서브유닛의 200번째의 Ala를 Val로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 참고예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<373> 참고예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 38 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 참고예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 29를 얻었다.

<374> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<375> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그

결과, 표 29에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 200번째의 Ala가 Val로 치환되어 있었다.

표 29

<376>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 29	β-200번째	Ala	Val	GCC	GTC

<377> [참고예 30] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(30)

<378> β-서브유닛의 200번째의 Ala를 Glu로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 참고예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<379> 참고예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 39 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 참고예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 30을 얻었다.

<380> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<381> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 30에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 200번째의 Ala가 Glu로 치환되어 있었다.

표 30

<382>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 30	β-200번째	Ala	Glu	GCC	GAG

<383> [참고예 31] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(31)

<384> β-서브유닛의 212번째의 Ser를 Tyr로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 참고예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<385> 참고예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 40 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 참고예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 31을 얻었다.

<386> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<387> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그

결과, 표 31에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 212번째의 Ser가 Tyr로 치환되어 있었다.

표 31

<388>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 31	β-212번째	Ser	Tyr	TCC	TAC

<389> [참고예 32] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(32)

<390> 클론 No. 5의 아미노산 변이(α-서브유닛의 19번째: Ala가 Val)와 클론 No. 11의 아미노산 변이(α-서브유닛의 126번째: Phe가 Tyr)를 함께 갖고 있는 아미노산 치환체에 있어서도 니트릴히드라타제 활성이 보유되어 있는 것을 확인하였다.

<391> 30mL의 시험관에 10mL의 LB 액체 배지를 조제하여, 121℃·20분간 오토클레이브에 의해 멸균하였다. 상기 배지에 최종 농도가 100㎍/㎖가 되도록 암피실린을 첨가한 후, 참고예 11에서 얻어진 클론 No. 11을 1백금이 접종하여, 37℃·300rpm으로 약 20시간 배양하였다. 상기 배양액 1mL를 적당한 원심 튜브에 분취한 후, 원심분리(15000rpm × 5분)에 의해 균체를 분리하였다. 이어서, 알칼리 SDS 추출법에 의해 상기 균체로부터 클론 No. 11의 플라스미드 DNA를 조제하였다.

<392> 클론 No. 11의 플라스미드 DNA 1㎍을 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 14 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 참고예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 32를 얻었다.

<393> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<394> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 32에 나타낸 바와 같이 야생형 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 19번째의 Ala가 Val로, α-서브유닛의 126번째의 Phe가 Tyr로 각각 치환되어 있었다.

표 32

<395>

클론 번호	변이 개소 (α-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		야생형	변이체	야생형	변이체
No. 32	α-19번째 α-126번째	Ala Phe	Val Tyr	GCG TTC	GTG TAC

<396> [참고예 33] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(33)

<397> 클론 No. 1의 아미노산 변이(α-서브유닛의 6번째: Leu가 Met임)와 클론 No. 32의 아미노산 변이(α-서브유닛의 19번째의 Ala가 Val이고; α-서브유닛의 126번째의 Phe가 Tyr임)를 함께 갖고 있는 아미노산 치환체에 있어서도 니트릴히드라타제 활성이 보유되어 있는 것을 확인하였다.

<398> 30mL의 시험관에 10mL의 LB 액체 배지를 조제하여, 121℃·20분간 오토클레이브에 의해 멸균하였다. 상기 배지에 최종 농도가 100㎍/㎖가 되도록 암피실린을 첨가한 후, 참고예 32에서 얻어진 클론 No. 32를 1백금이 접종하여, 37℃·300rpm으로 약 20시간 배양하였다. 상기 배양액 1mL를 적당한 원심 튜브에 분취한 후, 원심분리(15000rpm × 5분)에 의해 균체를 분리하였다. 이어서, 알칼리 SDS 추출법에 의해 상기 균체로부터 클론 No. 32

의 플라스미드 DNA를 조제하였다.

<399> 클론 No. 32의 플라스미드 DNA 1㎍을 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 7 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 참고예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 33을 얻었다.

<400> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<401> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 33에 나타낸 바와 같이 야생형 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 6번째의 Leu가 Met로, α-서브유닛의 19번째의 Ala가 Val로, α-서브유닛의 126번째의 Phe가 Tyr로 각각 치환되어 있었다.

표 33

<402>

클론 번호	변이 개소 (α-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		야생형	변이체	야생형	변이체
No. 33	α-6번째	Leu	Met	CTG	ATG
	α-19번째	Ala	Val	GCG	GTG
	α-126번째	Phe	Tyr	TTC	TAC

<403> [참고예 34] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(34)

<404> 클론 No. 2의 아미노산 변이(α-서브유닛의 6번째: Leu가 Thr)와 클론 No. 32의 아미노산 변이(α-서브유닛의 19번째의 Ala가 Val이고; α-서브유닛의 126번째의 Phe가 Tyr임)를 함께 갖고 있는 아미노산 치환체에 있어서도 니트릴히드라타제 활성이 보유되어 있는 것을 확인하였다.

<405> 참고예 33에서 조제한 클론 No. 32의 플라스미드 DNA 1㎍을 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 11 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 참고예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 34를 얻었다.

<406> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<407> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 34에 나타낸 바와 같이 야생형 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 6번째의 Leu가 Thr로, α-서브유닛의 19번째의 Ala가 Val로, α-서브유닛의 126번째의 Phe가 Tyr로 각각 치환되어 있었다.

표 34

<408>

클론 번호	변이 개소 (α-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		야생형	변이체	야생형	변이체

No. 34	α-6번째 α-19번째 α-126번째	Leu Ala Phe	Thr Val Tyr	CTG GCG TTC	ACG GTG TAC

<409> [참고예 35] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(35)

<410> 클론 No. 3의 아미노산 변이(α-서브유닛의 6번째: Leu가 Ala)와 클론 No. 32의 아미노산 변이(α-서브유닛의 19번째의 Ala가 Val이고; α-서브유닛의 126번째의 Phe가 Tyr임)를 함께 갖고 있는 아미노산 치환체에 있어서도 니트릴히드라타제 활성이 보유되어 있는 것을 확인하였다.

<411> 참고예 33에서 조제한 클론 No. 32의 플라스미드 DNA 1㎍을 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 12 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 참고예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 35를 얻었다.

<412> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<413> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 35에 나타낸 바와 같이 야생형 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 6번째의 Leu가 Ala로, α-서브유닛의 19번째의 Ala가 Val로, α-서브유닛의 126번째의 Phe가 Tyr로 각각 치환되어 있었다.

표 35

<414>

클론 번호	변이 개소 (α-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		야생형	변이체	야생형	변이체
No. 35	α-6번째 α-19번째 α-126번째	Leu Ala Phe	Ala Val Tyr	CTG GCG TTC	GCG GTG TAC

<415> [참고예 36] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(36)

<416> 클론 No. 20의 아미노산 변이(β-서브유닛의 108번째: Glu가 Asp)와 클론 No. 31의 아미노산 변이(β-서브유닛의 212번째: Ser가 Tyr)를 함께 갖고 있는 아미노산 치환체에 있어서도 니트릴히드라타제 활성이 보유되어 있는 것을 확인하였다.

<417> 30mL의 시험관에 10mL의 LB 액체 배지를 조제하여, 121℃·20분간 오토클레이브에 의해 멸균하였다. 상기 배지에 최종 농도가 100㎍/㎖가 되도록 암피실린을 첨가한 후, 참고예 31에서 얻어진 클론 No. 31을 1백금이 접종하여, 37℃·300rpm으로 약 20시간 배양하였다. 상기 배양액 1mL를 적당한 원심 튜브에 분취한 후, 원심분리(15000rpm × 5분)에 의해 균체를 분리하였다. 이어서, 알칼리 SDS 추출법에 의해 상기 균체로부터 클론 No. 31의 플라스미드 DNA를 조제하였다.

<418> 클론 No. 31의 플라스미드 DNA 1㎍을 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 29 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 참고예 1

과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 36을 얻었다.

<419> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<420> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 36에 나타낸 바와 같이 야생형 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 108번째의 Glu가 Asp로, β-서브유닛의 212번째의 Ser가 Tyr로 각각 치환되어 있었다.

표 36

<421>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		야생형	변이체	야생형	변이체
No. 36	β-108번째	Glu	Asp	GAG	GAT
	β-212번째	Ser	Tyr	TCC	TAC

<422> [참고예 37] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(37)

<423> 클론 No. 23의 아미노산 변이(β-서브유닛의 108번째: Glu가 Arg임)와 클론 No. 31의 아미노산 변이(β-서브유닛의 212번째: Ser가 Tyr임)를 함께 갖고 있는 아미노산 치환체에 있어서도 니트릴히드라타제 활성이 보유되어 있는 것을 확인하였다.

<424> 참고예 36에서 조제한 클론 No. 31의 플라스미드 DNA 1㎍을 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 32 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 참고예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 37을 얻었다.

<425> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<426> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 37에 나타낸 바와 같이 야생형 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 108번째의 Glu가 Arg로, β-서브유닛의 212번째의 Ser가 Tyr로 각각 치환되어 있었다.

표 37

<427>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		야생형	변이체	야생형	변이체
No. 37	β-108번째	Glu	Arg	GAG	CGG
	β-212번째	Ser	Tyr	TCC	TAC

<428> [참고예 38] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(38)

<429> 클론 No. 27의 아미노산 변이(β-서브유닛의 200번째: Ala가 Asp임)와 클론 No. 31의 아미노산 변이(β-서브유닛의 212번째: Ser가 Tyr임)를 함께 갖고 있는 아미노산 치환체에 있어서도 니트릴히드라타제 활성이 보유되어 있는 것을 확인하였다.

<430> 참고예 36에서 조제한 클론 No. 31의 플라스미드 DNA 1㎍을 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 36 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2

는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 참고예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 38을 얻었다.

<431> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<432> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 38에 나타낸 바와 같이 야생형 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 200번째의 Ala가 Asp로, β-서브유닛의 212번째의 Ser가 Tyr로 각각 치환되어 있었다.

표 38

<433>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화			
		야생형	변이체	야생형	변이체
No. 38	β-200번째 β-212번째	Ala Ser	Asp Tyr	GCC TCC	GAC TAC

<434> [참고예 39] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(39)

<435> 클론 No. 30의 아미노산 변이(β-서브유닛의 200번째: Ala가 Glu)와 클론 No. 31의 아미노산 변이(β-서브유닛의 212번째: Ser가 Tyr)를 함께 갖고 있는 아미노산 치환체에 있어서도 니트릴히드라타제 활성이 보유되어 있는 것을 확인하였다.

<436> 참고예 36에서 조제한 클론 No. 31의 플라스미드 DNA 1㎍을 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호 39 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 참고예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 39를 얻었다.

<437> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<438> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 39에 나타낸 바와 같이 야생형 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 200번째의 Ala가 Glu로, β-서브유닛의 212번째의 Ser가 Tyr로 각각 치환되어 있었다.

표 39

<439>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		야생형	변이체	야생형	변이체
No. 39	β-200번째 β-212번째	Ala Ser	Glu Tyr	GCC TCC	GAG TAC

<440> [실시예 1] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(40)

<441> α-서브유닛의 36번째의 Thr를 Met로 치환하기 위해, 타카라 주조사 제조의 「LA PCR in vitro mutagenesis Kit」를 이용한 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다. 이후, 「LA PCR in vitro mutagenesis Kit」를 간단히 키트라고 칭한다. 이하의 실시예에서는 기본적으로 키트의 원리 및 조작 방법을 답습하였다.

<442> 30mL의 시험관에 10mL의 LB 액체 배지를 조제하여, 121℃·20분간 오토클레이브에 의해 멸균하였다. 상기 배지에 최종 농도가 100㎍/㎖가 되도록 암피실린을 첨가한 후, MT-10822를 1백금이 접종하여, 37℃·300rpm으로 약 20시간 배양하였다. 상기 배양액 1mL를 적당한 원심 튜브에 분취한 후, 원심분리(15000rpm × 5분)에 의해 균체를 분리하였다. 이어서, 알칼리 SDS 촙출법에 의해 상기 균체로부터 플라스미드 pPT-DB1을 조제하였다.

<443> 각각 10ng의 pPT-DB1을 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 41 기재의 프뜰이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 마이크로콘100(타카라 주조사 제조)을 이용하여 각각의 PCR 반응 종료액으로부터 과잉의 프라이머 및 dNTP를 제거한 후, TE를 가해 각각 50㎕의 용액을 조제하였다. 이 TE 용액을 각 0.5㎕씩 함유하는 전체량 47.5㎕의 어닐링 용액(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)을 조제하여, 열변성 처리(98℃)를 10분간 행한 후, 37℃까지 60분간 걸쳐 일정한 속도로 냉각을 행하고, 이어서 37℃에서 15분간 유지함으로써 어닐링 처리를 행하였다. 어닐링 처리액에 TaKaRa LA Taq를 0.5㎕ 가해 72℃에서 3분간 가열 처리를 행하여, 헤테로 2본쇄를 완성시켰다. 이것에 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 가해 전체량을 50㎕로 한 후, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복하는 것에 의한 PCR 반응 No. 3을 행하였다. PCR 반응 No. 3의 반응 종료액 5㎕를 이용한 아가로스 겔 전기영동(시그마사 제조, 타입 VII 저융점 아가로스 사용; 아가로스 농도 0.8중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 약 2kbp의 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이어서, 아가로스 겔로부터 약 2kbp의 DNA 단편만을 잘라내어, 이 아가로스편(약 0.1g)을 미세하게 분쇄하여 1mL의 TE 용액에 현탁한 후, 55℃에서 1시간 보온하여 아가로스를 완전하게 융해시켰다. 이 융해액에 대해서 페놀/클로로포름 추출과 에탄올 침전을 행하여 상기 DNA 단편을 정제하여, 최종적으로 10㎕의 TE에 용해시켰다. 정제한 약 2kbp의 증폭 DNA 단편을 제한효소 EcoRI 및 HindIII에 의해 절단한 후, 이 제한효소 처리액에 대해서 페놀/클로로포름 추출과 에탄올 침전을 행하여 상기 DNA 단편을 정제하여, 최종적으로 10㎕의 TE에 용해시켰다. 마찬가지로, EcoRI 및 HindIII에 의해 pPT-DB1을 절단하여, 아가로스 겔 전기영동(시그마사 제조, 타입 VII 저융점 아가로스 사용; 아가로스 농도 0.7%)을 행하여, 아가로스 겔로부터 약 2.7kbp의 DNA 단편만을 잘라내었다. 잘라낸 아가로스편(약 0.1g)을 미세하게 분쇄하여 1mL의 TE 용액에 현탁한 후, 55℃에서 1시간 보온하여 아가로스를 완전하게 융해시켰다. 이 융해액에 대해서 페놀/클로로포름 추출과 에탄올 침전을 행하여 상기 DNA 단편을 정제하여, 최종적으로 10㎕의 TE에 용해시켰다. 이와 같이 하여 얻어진 약 2kbp와 약 2.7kbp의 DNA 단편을 DNA 라이게이션 키트(타카라 주조사 제조)를 이용하여 연결시킨 후, 대장균 HB101의 캄피턴트 세포(토요 방적사 제조)를 형질전환하여, 형질전환체 No. 40을 얻었다.

<444> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<445> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 40에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 36번째의 Thr이 Met로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 40

<446>

클론 번호	변이 개소 (α-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 40	α-36번째	Thr	Met	ACG	ATG

<447> [실시예 2] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(41)

<448> α-서브유닛의 71번째의 Arg을 His로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<449> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 42 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 41을 얻었다.

<450> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<451> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 41에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 71번째의 Arg가 His로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 41

<452>

클론 번호	변이 개소 (α-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 41	α-71번째	Arg	His	CGT	CAT

<453> [실시예 3] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(42)

<454> α-서브유닛의 148번째의 Gly를 Asp로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<455> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 43 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 42를 얻었다.

<456> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<457> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 42에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 148번째의 Gly가 Asp로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 42

<458>

클론 번호	변이 개소 (α-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 42	α-148번째	Gly	Asp	GGC	GAC

<459> [실시예 4] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(43)

<460> α-서브유닛의 204번째의 Val를 Arg로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<461> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 44 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 43을 얻었다.

<462> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<463> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 43에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 204번째의 Val이 Arg로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 43

<464>

클론 번호	변이 개소 (α-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 43	α-204번째	Val	Arg	GTC	CGC

<465> [실시예 5] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(44)

<466> α-서브유닛의 204번째의 Val를 Lys로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<467> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 45 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 44를 얻었다.

<468> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<469> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 44에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 204번째의 Val이 Lys로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 44

<470>

클론 번호	변이 개소 (α-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 44	α-204번째	Val	Lys	GTC	AAA

<471> [실시예 6] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(45)

<472> α-서브유닛의 204번째의 Val를 Trp로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<473> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 46 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 45를 얻었다.

<474> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<475> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 45에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 204번째의 Val이 Trp로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 45

<476>

클론 번호	변이 개소 (α-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 45	α-204번째	Val	Trp	GTC	TGG

<477> [실시예 7] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(46)

<478> α-서브유닛의 204번째의 Val를 Thr로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<479> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 47 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 46을 얻었다.

<480> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<481> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 46에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 204번째의 Val이 Thr로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 46

<482>

클론 번호	변이 개소 (α-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 46	α-204번째	Val	Thr	GTC	ACC

<483> [실시예 8] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(47)

<484> β-서브유닛의 10번째의 Thr를 Asp로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<485> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 48 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 47을 얻었다.

<486> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<487> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 47에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 10번째의 Thr이 Asp로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 47

<488>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 47	β-10번째	Thr	Asp	ACC	GAC

<489> [실시예 9] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(48)

<490> β-서브유닛의 10번째의 Thr를 Glu로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<491> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 49 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 48을 얻었다.

<492> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<493> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 48에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 10번째의 Thr이 Glu로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 48

<494>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 48	β-10번째	Thr	Glu	ACC	GAA

<495> [실시예 10] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(49)

<496> β-서브유닛의 10번째의 Thr를 Trp로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<497> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 50 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 49를 얻었다.

<498> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<499> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 49에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 10번째의 Thr이 Trp로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 49

<500>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 49	β-10번째	Thr	Trp	ACC	TGG

<501> [실시예 11] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(50)

<502> β-서브유닛의 10번째의 Thr를 Gly로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<503> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 51 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 50을 얻었다.

<504> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<505> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 50에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 10번째의 Thr이 Gly로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 50

<506>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 50	β-10번째	Thr	Gly	ACC	GGC

<507> [실시예 12] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(51)

<508> β-서브유닛의 10번째의 Thr를 Tyr로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<509> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 52 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 51을 얻었다.

<510> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<511> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 51에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 10번째의 Thr이 Tyr로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 51

<512>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 51	β-10번째	Thr	Tyr	ACC	TAC

<513> [실시예 13] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(52)

<514> β-서브유닛의 10번째의 Thr를 Cys로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<515> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 53 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 52를 얻었다.

<516> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<517> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 52에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 10번째의 Thr이 Cys로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 52

<518>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 52	β-10번째	Thr	Cys	ACC	TGC

<519> [실시예 14] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(53)

<520> β-서브유닛의 32번째의 Val를 Gly로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<521> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 54 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재함) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재함)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 53을 얻었다.

<522> 이후, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<523> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 53에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 32번째의 Val이 Gly로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 53

<524>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 53	β-32번째	Val	Gly	GTC	GGC

<525> [실시예 15] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(54)

<526> β-서브유닛의 37번째의 Phe를 Thr로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<527> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 55 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 54를 얻었다.

<528> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<529> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 54에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 37번째의 Phe가 Thr로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 54

<530>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 54	β-37번째	Phe	Thr	TTC	ACC

<531> [실시예 16] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(55)

<532> β-서브유닛의 37번째의 Phe를 Ala로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<533> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 56 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 55를 얻었다.

<534> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<535> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 55에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 37번째의 Phe가 Ala로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 55

<536>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 55	β-37번째	Phe	Ala	TTC	GCC

<537> [실시예 17] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(56)

<538> β-서브유닛의 37번째의 Phe를 Leu로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<539> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 57 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 56을 얻었다.

<540> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<541> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 56에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 37번째의 Phe가 Leu로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 56

<542>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 56	β-37번째	Phe	Leu	TTC	CTC

<543> [실시예 18] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(57)

<544> β-서브유닛의 37번째의 Phe를 Ile로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<545> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 58 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 57을 얻었다.

<546> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<547> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 57에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 37번째의 Phe가 Ile로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 57

<548>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 57	β-37번째	Phe	Ile	TTC	ATC

<549> [실시예 19] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(58)

<550> β-서브유닛의 37번째의 Phe를 Val로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<551> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 59 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 58을 얻었다.

<552> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<553> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 58에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 37번째의 Phe가 Val로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 58

<554>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 58	β-37번째	Phe	Val	TTC	GTC

<555> [실시예 20] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(59)

<556> β-서브유닛의 41번째의 Phe를 Glu로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<557> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 60 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 59를 얻었다.

<558> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<559> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 59에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 41번째의 Phe가 Glu로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 59

<560>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 59	β-41번째	Phe	Glu	TTC	GAA

<561> [실시예 21] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(60)

<562> β-서브유닛의 41번째의 Phe를 Thr로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<563> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 61 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 60을 얻었다.

<564> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<565> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 60에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 41번째의 Phe가 Thr로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 60

<566>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 60	β-41번째	Phe	Thr	TTC	ACC

<567> [실시예 22] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(61)

<568> β-서브유닛의 41번째의 Phe를 Ala로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<569> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 62 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 61을 얻었다.

<570> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<571> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 61에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 41번째의 Phe가 Ala로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 61

<572>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 61	β-41번째	Phe	Ala	TTC	GCC

<573> [실시예 23] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(62)

<574> β-서브유닛의 41번째의 Phe를 Leu로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<575> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 63 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 62를 얻었다.

<576> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<577> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 62에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 41번째의 Phe가 Leu로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 62

<578>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 62	β-41번째	Phe	Leu	TTC	CTC

<579> [실시예 24] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(63)

<580> β-서브유닛의 41번째의 Phe를 Ile로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<581> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 64 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 63을 얻었다.

<582> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<583> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 63에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 41번째의 Phe가 Ile로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 63

<584>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 63	β-41번째	Phe	Ile	TTC	ATC

<585> [실시예 25] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(64)

<586> β-서브유닛의 41번째의 Phe를 Val로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<587> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 65 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 64를 얻었다.

<588> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<589> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 64에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 41번째의 Phe가 Val로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 64

<590>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 64	β-41번째	Phe	Val	TTC	GTC

<591> [실시예 26] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(65)

<592> β-서브유닛의 46번째의 Met를 Gly로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<593> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 66 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 65를 얻었다.

<594> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<595> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 65에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 46번째의 Met가 Gly로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 65

<596>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 65	β-46번째	Met	Gly	ATG	GGG

<597> [실시예 27] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(66)

<598> β-서브유닛의 46번째의 Met를 Tyr로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<599> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 67 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 66을 얻었다.

<600> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<601> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 66에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 46번째의 Met가 Tyr로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 66

<602>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 66	β-46번째	Met	Tyr	ATG	TAT

<603> [실시예 28] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(67)

<604> β-서브유닛의 46번째의 Met를 Leu로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<605> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 68 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 67을 얻었다.

<606> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<607> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 67에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 46번째의 Met가 Leu로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 67

<608>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 67	β-46번째	Met	Leu	ATG	CTG

<609> [실시예 29] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(68)

<610> β-서브유닛의 46번째의 Met를 Lys로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<611> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 69 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 68을 얻었다.

<612> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<613> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 68에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 46번째의 Met가 Lys로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 68

<614>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 68	β-46번째	Met	Lys	ATG	AAG

<615> [실시예 30] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(69)

<616> β-서브유닛의 46번째의 Met를 Asp로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<617> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 70 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 69를 얻었다.

<618> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<619> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 69에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 46번째의 Met가 Asp로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 69

<620>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 69	β-46번째	Met	Asp	ATG	GAT

<621> [실시예 31] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(70)

<622> β-서브유닛의 48번째의 Leu를 Gly로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<623> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 71 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 70을 얻었다.

<624> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<625> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 70에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 48번째의 Leu가 Gly로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 70

<626>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 70	β-48번째	Leu	Gly	CTG	GGG

<627> [실시예 32] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(71)

<628> β-서브유닛의 48번째의 Leu를 Ala로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<629> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 72 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 71을 얻었다.

<630> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<631> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 71에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 48번째의 Leu가 Ala로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 71

<632>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 71	β-48번째	Leu	Ala	CTG	GCG

<633> [실시예 33] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(72)

<634> β-서브유닛의 48번째의 Leu를 Val로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<635> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 73 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 72를 얻었다.

<636> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<637> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 72에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 48번째의 Leu가 Val로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 72

<638>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 72	β-48번째	Leu	Val	CTG	GTG

<639> [실시예 34] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(73)

<640> β-서브유닛의 48번째의 Leu를 Ser로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<641> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 74 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 73을 얻었다.

<642> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<643> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 73에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 48번째의 Leu가 Ser로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 73

<644>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 73	β-48번째	Leu	Ser	CTG	TCG

<645> [실시예 35] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(74)

<646> β-서브유닛의 48번째의 Leu를 Thr로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<647> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 75 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 74를 얻었다.

<648> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<649> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 74에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 48번째의 Leu가 Thr로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 74

<650>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 74	β-48번째	Leu	Thr	CTG	ACG

<651> [실시예 36] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(75)

<652> β-서브유닛의 48번째의 Leu를 Arg로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<653> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 76 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 75를 얻었다.

<654> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<655> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 75에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 48번째의 Leu가 Arg로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 75

<656>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 75	β-48번째	Leu	Arg	CTG	CGG

<657> [실시예 37] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(76)

<658> β-서브유닛의 51번째의 Phe를 Ala로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<659> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 77 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 76을 얻었다.

<660> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<661> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 76에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 51번째의 Phe가 Ala로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 76

<662>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 76	β-51번째	Phe	Ala	TTC	GCC

<663> [실시예 38] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(77)

<664> β-서브유닛의 51번째의 Phe를 Val로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<665> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 78 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 77을 얻었다.

<666> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<667> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 77에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 51번째의 Phe가 Val로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 77

<668>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 77	β-51번째	Phe	Val	TTC	GTC

<669> [실시예 39] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(78)

<670> β-서브유닛의 72번째의 Trp를 Phe로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<671> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 79 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 78을 얻었다.

<672> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<673> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 78에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 72번째의 Trp가 Phe로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 78

<674>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 78	β-72번째	Trp	Phe	TGG	TTT

<675> [실시예 40] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(79)

<676> β-서브유닛의 118번째의 Phe를 Ala로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<677> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 80 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 79를 얻었다.

<678> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<679> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 79에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 118번째의 Phe가 Ala로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 79

<680>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 79	β-118번째	Phe	Ala	TTC	GCC

<681> [실시예 41] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(80)

<682> β-서브유닛의 118번째의 Phe를 Leu로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<683> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 81 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 80을 얻었다.

<684> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<685> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 80에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 118번째의 Phe가 Leu로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 80

<686>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 80	β-118번째	Phe	Leu	TTC	CTC

<687> [실시예 42] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(81)

<688> β-서브유닛의 118번째의 Phe를 Ile로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<689> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 82 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 81을 얻었다.

<690> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<691> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 81에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 118번째의 Phe가 Ile로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 81

<692>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 81	β-118번째	Phe	Ile	TTC	ATC

<693> [실시예 43] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(82)

<694> β-서브유닛의 118번째의 Phe를 Val로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<695> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 83 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 82를 얻었다.

<696> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<697> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 82에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 118번째의 Phe가 Val로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 82

<698>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 82	β-118번째	Phe	Val	TTC	GTC

<699> [실시예 44] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(83)

<700> β-서브유닛의 127번째의 Leu를 Ala로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<701> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 84 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 83을 얻었다.

<702> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<703> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 83에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 127번째의 Leu가 Ala로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 83

<704>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 83	β-127번째	Leu	Ala	CTG	GCG

<705> [실시예 45] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(84)

<706> β-서브유닛의 127번째의 Leu를 Val로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<707> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 85 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 84를 얻었다.

<708> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<709> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 84에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 127번째의 Leu가 Val로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 84

<710>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 84	β-127번째	Leu	Val	CTG	GTG

<711> [실시예 46] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(85)

<712> β-서브유닛의 127번째의 Leu를 Ser로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<713> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 86 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 85를 얻었다.

<714> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<715> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 85에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 127번째의 Leu가 Ser로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 85

<716>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 85	β-127번째	Leu	Ser	CTG	TCG

<717> [실시예 47] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(86)

<718> β-서브유닛의 146번째의 Arg을 Gly로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<719> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 87 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 86을 얻었다.

<720> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<721> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 86에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 146번째의 Arg가 Gly로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 86

<722>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 86	β-146번째	Arg	Gly	CGG	GGG

<723> [실시예 48] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(87)

<724> β-서브유닛의 160번째의 Arg을 Leu로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<725> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 88 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 87을 얻었다.

<726> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<727> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 87에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 160번째의 Arg가 Leu로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 87

<728>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 87	β-160번째	Arg	Leu	CGG	CTG

<729> [실시예 49] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(88)

<730> β-서브유닛의 160번째의 Arg을 Trp로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<731> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 89 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 88을 얻었다.

<732> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<733> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 88에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 160번째의 Arg가 Trp로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 88

<734>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 88	β-160번째	Arg	Trp	CGG	TGG

<735> [실시예 50] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(89)

<736> β-서브유닛의 186번째의 Leu를 Glu로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<737> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 90 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 89를 얻었다.

<738> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<739> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 89에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 186번째의 Leu가 Glu로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 89

<740>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 89	β-186번째	Leu	Glu	CTG	GAG

<741> [실시예 51] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(90)

<742> β-서브유닛의 186번째의 Leu를 Asp로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<743> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 91 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 90을 얻었다.

<744> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<745> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 90에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 186번째의 Leu가 Asp로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 90

<746>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 90	β-186번째	Leu	Asp	CTG	GAT

<747> [실시예 52] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(91)

<748> β-서브유닛의 186번째의 Leu를 Lys로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<749> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 92 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 91을 얻었다.

<750> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<751> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 91에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 186번째의 Leu가 Lys로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 91

<752>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 91	β-186번째	Leu	Lys	CTG	AAG

<753> [실시예 53] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(92)

<754> β-서브유닛의 186번째의 Leu를 Arg로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<755> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 93 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 92를 얻었다.

<756> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<757> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 92에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 186번째의 Leu가 Arg로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 92

<758>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 92	β-186번째	Leu	Arg	CTG	CGG

<759> [실시예 54] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(93)

<760> β-서브유닛의 186번째의 Leu를 Asn로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<761> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 94 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 93을 얻었다.

<762> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<763> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 93에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 186번째의 Leu가 Asn로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 93

<764>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 93	β-186번째	Leu	Asn	CTG	AAC

<765> [실시예 55] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(94)

<766> β-서브유닛의 186번째의 Leu를 Ser로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<767> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 95 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 94를 얻었다.

<768> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<769> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 94에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 186번째의 Leu가 Ser로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 94

<770>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 94	β-186번째	Leu	Ser	CTG	TCG

<771> [실시예 56] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(95)

<772> β-서브유닛의 186번째의 Leu를 Gly로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<773> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 96 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 95를 얻었다.

<774> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<775> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 95에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 186번째의 Leu가 Gly로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 95

<776>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 95	β-186번째	Leu	Gly	CTG	GGG

<777> [실시예 57] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(96)

<778> β-서브유닛의 217번째의 Asp를 Gly로 치환하기 위해, pPT-DB1 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 실시예 1과 동일한 조작에 의해 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다.

<779> 실시예 1에서 조제한 pPT-DB1의 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 97 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 96을 얻었다.

<780> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<781> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 96에 나타낸 클론에 있어서 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 217번째의 Asp가 Gly로 치환되어 있는 것을 확인하였다.

표 96

<782>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		치환 전	치환 후	치환 전	치환 후
No. 96	β-217번째	Asp	Gly	GAC	GGC

<783> [실시예 58] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(97)

<784> 클론 No. 40의 아미노산 변이(α-서브유닛의 36번째: Thr이 Met)와 클론 No. 11의 아미노산 변이(α-서브유닛의 126번째: Phe가 Tyr)를 함께 갖고 있는 아미노산 치환체에 있어서도 니트릴히드라타제 활성이 보유되어 있는 것

을 확인하였다.

<785> 30mL의 시험관에 10mL의 LB 액체 배지를 조제하여, 121℃·20분간 오토클레이브에 의해 멸균하였다. 상기 배지에 최종 농도가 100㎍/㎖가 되도록 암피실린을 첨가한 후, 참고예 11에서 얻어진 클론 No. 11을 1백금이(one platinum loop) 접종하여, 37℃·300rpm으로 약 20시간 배양하였다. 상기 배양액 1mL를 적당한 원심 튜브에 분취한 후, 원심분리(15000rpm × 5분)에 의해 균체를 분리하였다. 이어서, 알칼리 SDS 추출법에 의해 상기 균체로부터 플라스미드 DNA를 조제하였다.

<786> 조제한 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 41 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 97을 얻었다.

<787> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<788> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 97에 나타낸 바와 같이 야생형 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 36번째의 Thr이 Met로, α-서브유닛의 126번째의 Phe가 Tyr로 각각 치환되어 있었다.

표 97

<789>

클론 번호	변이 개소 (α-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		야생형	변이체	야생형	변이체
No. 97	α-36번째 α-126번째	Thr Phe	Met Tyr	ACG TTC	ATG TAC

<790> [실시예 59] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(98)

<791> 클론 No. 42의 아미노산 변이(α-서브유닛의 148번째: Gly가 Asp)와 클론 No. 43의 아미노산 변이(α-서브유닛의 204번째: Val이 Arg)를 함께 갖고 있는 아미노산 치환체에 있어서도 니트릴히드라타제 활성이 보유되어 있는 것을 확인하였다.

<792> 30mL의 시험관에 10mL의 LB 액체 배지를 조제하여, 121℃·20분간 오토클레이브에 의해 멸균하였다. 상기 배지에 최종 농도가 100㎍/㎖가 되도록 암피실린을 첨가한 후, 실시예 4에서 얻어진 클론 No. 43을 1백금이 접종하여, 37℃·300rpm으로 약 20시간 배양하였다. 상기 배양액 1mL를 적당한 원심 튜브에 분취한 후, 원심분리(15000rpm × 5분)에 의해 균체를 분리하였다. 이어서, 알칼리 SDS 추출법에 의해 상기 균체로부터 플라스미드 DNA를 조제하였다.

<793> 조제한 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 43 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 98을 얻었다.

<794> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<795> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 98에 나타낸 바와 같이 야생형 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 148번째의 Gly가 Asp로, α-서브유닛의 204번째의 Val이 Arg로 각각 치환되어 있었다.

표 98

<796>

클론 번호	변이 개소 (α-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		야생형	변이체	야생형	변이체
No. 98	α-148번째 α-204번째	Gly Val	Asp Arg	GGC GTC	GAC CGC

<797> [실시예 60] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(99)

<798> 클론 No. 77의 아미노산 변이(β-서브유닛의 51번째: Phe가 Val)와 클론 No. 20의 아미노산 변이(β-서브유닛의 108번째: Glu가 Asp)를 함께 갖고 있는 아미노산 치환체에 있어서도 니트릴히드라타제 활성이 보유되어 있는 것을 확인하였다.

<799> 30mL의 시험관에 10mL의 LB 액체 배지를 조제하여, 121℃·20분간 오토클레이브에 의해 멸균하였다. 상기 배지에 최종 농도가 100㎍/㎖가 되도록 암피실린을 첨가한 후, 참고예 20에서 얻어진 클론 No. 20을 1백금이 접종하여, 37℃·300rpm으로 약 20시간 배양하였다. 상기 배양액 1mL를 적당한 원심 튜브에 분취한 후, 원심분리(15000rpm × 5분)에 의해 균체를 분리하였다. 이어서, 알칼리 SDS 추출법에 의해 상기 균체로부터 플라스미드 DNA를 조제하였다.

<800> 조제한 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 78 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 99를 얻었다.

<801> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<802> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 99에 나타낸 바와 같이 야생형 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 51번째의 Phe가 Val로, β-서브유닛의 108번째의 Glu가 Asp로 각각 치환되어 있었다.

표 99

<803>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		야생형	변이체	야생형	변이체
No. 99	β-51번째 β-108번째	Phe Glu	Val Asp	TTC GAG	GTC GAT

<804> [참고예 40] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(100)

<805> 클론 No. 20의 아미노산 변이(β-서브유닛의 108번째: Glu가 Asp)와 클론 No. 30의 아미노산 변이(β-서브유닛의 200번째: Ala가 Glu)를 함께 갖고 있는 아미노산 치환체에 있어서도 니트릴히드라타제 활성이 보유되어 있는 것을 확인하였다.

<806> 30mL의 시험관에 10mL의 LB 액체 배지를 조제하여, 121℃·20분간 오토클레이브에 의해 멸균하였다. 상기 배지에 최종 농도가 100㎍/㎖가 되도록 암피실린을 첨가한 후, 참고예 30에서 얻어진 클론 No. 30을 1백금이 접종하

여, 37℃·300rpm으로 약 20시간 배양하였다. 상기 배양액 1mL를 적당한 원심 튜브에 분취한 후, 원심분리(15000rpm × 5분)에 의해 균체를 분리하였다. 이어서, 알칼리 SDS 추출법에 의해 상기 균체로부터 플라스미드 DNA를 조제하였다.

<807> 조제한 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 29 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 100을 얻었다.

<808> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<809> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 100에 나타낸 바와 같이 야생형 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 108번째의 Glu가 Asp로, β-서브유닛의 200번째의 Ala가 Glu로 각각 치환되어 있었다.

표 100

<810>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		야생형	변이체	야생형	변이체
No. 100	β-108번째 β-200번째	Glu Ala	Asp Glu	GAG GCC	GAT GAA

<811> [실시예 61] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(101)

<812> 클론 No. 82의 아미노산 변이(β-서브유닛의 118번째: Phe가 Val)와 클론 No. 30의 아미노산 변이(β-서브유닛의 200번째: Ala가 Glu)를 함께 갖고 있는 아미노산 치환체에 있어서도 니트릴히드라타제 활성이 보유되어 있는 것을 확인하였다.

<813> 30mL의 시험관에 10mL의 LB 액체 배지를 조제하여, 121℃·20분간 오토클레이브에 의해 멸균하였다. 상기 배지에 최종 농도가 100㎍/㎖가 되도록 암피실린을 첨가한 후, 참고예 30에서 얻어진 클론 No. 30을 1백금이 접종하여, 37℃·300rpm으로 약 20시간 배양하였다. 상기 배양액 1mL를 적당한 원심 튜브에 분취한 후, 원심분리(15000rpm × 5분)에 의해 균체를 분리하였다. 이어서, 알칼리 SDS 추출법에 의해 상기 균체로부터 플라스미드 DNA를 조제하였다.

<814> 조제한 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 83 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 101을 얻었다.

<815> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<816> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 101에 나타낸 바와 같이 야생형 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 118번째의 Phe가 Val로, β-서브유닛의 200번째의 Ala가 Glu로 각각 치환되어 있었다.

표 101

<817>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		야생형	변이체	야생형	변이체
No. 101	β-118번째 β-200번째	Phe Ala	Val Glu	TTC GCC	GTC GAA

<818> [실시예 62] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(102)

<819> 클론 No. 88의 아미노산 변이(β-서브유닛의 160번째: Arg가 Trp)와 클론 No. 92의 아미노산 변이(β-서브유닛의 186번째: Leu가 Arg)를 함께 갖고 있는 아미노산 치환체에 있어서도 니트릴히드라타제 활성이 보유되어 있는 것을 확인하였다.

<820> 30mL의 시험관에 10mL의 LB 액체 배지를 조제하여, 121℃·20분간 오토클레이브에 의해 멸균하였다. 상기 배지에 최종 농도가 100㎍/㎖가 되도록 암피실린을 첨가한 후, 실시예 53에서 얻어진 클론 No. 92를 1백금이 접종하여, 37℃·300rpm으로 약 20시간 배양하였다. 상기 배양액 1mL를 적당한 원심 튜브에 분취한 후, 원심분리(15000rpm × 5분)에 의해 균체를 분리하였다. 이어서, 알칼리 SDS 추출법에 의해 상기 균체로부터 플라스미드 DNA를 조제하였다.

<821> 조제한 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 89 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 102를 얻었다.

<822> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<823> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 102에 나타낸 바와 같이 야생형 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 160번째의 Arg가 Trp로, β-서브유닛의 186번째의 Leu가 Arg로 각각 치환되어 있었다.

표 102

<824>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		야생형	변이체	야생형	변이체
No. 102	β-160번째 β-186번째	Arg Leu	Trp Arg	CGG CTG	TGG CGG

<825> [실시예 63] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(103)

<826> 클론 No. 2의 아미노산 변이(α-서브유닛의 6번째: Leu가 Thr)와 클론 No. 97의 아미노산 변이(α-서브유닛의 36번째: Thr이 Met; α-서브유닛의 126번째: Phe가 Tyr)를 함께 갖고 있는 아미노산 치환체에 있어서도 니트릴히드라타제 활성이 보유되어 있는 것을 확인하였다.

<827> 30mL의 시험관에 10mL의 LB 액체 배지를 조제하여, 121℃·20분간 오토클레이브에 의해 멸균하였다. 상기 배지에 최종 농도가 100㎍/㎖가 되도록 암피실린을 첨가한 후, 실시예 58에서 얻어진 클론 No. 97을 1백금이 접종하여, 37℃·300rpm으로 약 20시간 배양하였다. 상기 배양액 1mL를 적당한 원심 튜브에 분취한 후, 원심분리(15000rpm × 5분)에 의해 균체를 분리하였다. 이어서, 알칼리 SDS 추출법에 의해 상기 균체로부터 플라스미드 DNA를 조제하였다.

<828> 조제한 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록

의 서열번호: 11 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 103을 얻었다.

<829> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<830> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 103에 나타낸 바와 같이 야생형 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 6번째의 Leu가 Thr로, α-서브유닛의 36번째의 Thr이 Met로, α-서브유닛의 126번째의 Phe가 Tyr로 각각 치환되어 있었다.

표 103

<831>

클론 번호	변이 개소 (α-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		야생형	변이체	야생형	변이체
No. 103	α-6번째	Leu	Thr	CTG	ACG
	α-36번째	Thr	Met	ACG	ATG
	α-126번째	Phe	Tyr	TTC	TAC

<832> [실시예 64] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(104)

<833> 클론 No. 41의 아미노산 변이(α-서브유닛의 71번째: Arg가 His)와 클론 No. 32의 아미노산 변이(α-서브유닛의 19번째: Ala가 Val; α-서브유닛의 126번째: Phe가 Tyr)를 함께 갖고 있는 아미노산 치환체에 있어서도 니트릴히드라타제 활성이 보유되어 있는 것을 확인하였다.

<834> 30mL의 시험관에 10mL의 LB 액체 배지를 조제하여, 121℃·20분간 오토클레이브에 의해 멸균하였다. 상기 배지에 최종 농도가 100㎍/㎖가 되도록 암피실린을 첨가한 후, 참고예 32에서 얻어진 클론 No. 32를 1백금이 접종하여, 37℃·300rpm으로 약 20시간 배양하였다. 상기 배양액 1mL를 적당한 원심 튜브에 분취한 후, 원심분리(15000rpm × 5분)에 의해 균체를 분리하였다. 이어서, 알칼리 SDS 추출법에 의해 상기 균체로부터 플라스미드 DNA를 조제하였다.

<835> 조제한 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 42 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 104를 얻었다.

<836> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<837> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 104에 나타낸 바와 같이 야생형 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 19번째의 Ala가 Val로, α-서브유닛의 71번째의 Arg가 His로, α-서브유닛의 126번째의 Phe가 Tyr로 각각 치환되어 있었다.

표 104

<838>

클론 번호	변이 개소 (α-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		야생형	변이체	야생형	변이체
No. 104	α-19번째	Ala	Val	GCG	GTG
	α-71번째	Arg	His	CGT	CAT
	α-126번째	Phe	Tyr	TTC	TAC

<839> [실시예 65] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(105)

<840> 클론 No. 40의 아미노산 변이(α-서브유닛의 36번째: Thr이 Met)와 클론 No. 98의 아미노산 변이(α-서브유닛의 148번째: Gly가 Asp; α-서브유닛의 204번째: Val이 Arg)를 함께 갖고 있는 아미노산 치환체에 있어서도 니트릴히드라타제 활성이 보유되어 있는 것을 확인하였다.

<841> 30mL의 시험관에 10mL의 LB 액체 배지를 조제하여, 121℃·20분간 오토클레이브에 의해 멸균하였다. 상기 배지에 최종 농도가 100㎍/㎖가 되도록 암피실린을 첨가한 후, 실시예 59에서 얻어진 클론 No. 98을 1백금이 접종하여, 37℃·300rpm으로 약 20시간 배양하였다. 상기 배양액 1mL를 적당한 원심 튜브에 분취한 후, 원심분리(15000rpm × 5분)에 의해 균체를 분리하였다. 이어서, 알칼리 SDS 추출법에 의해 상기 균체로부터 플라스미드 DNA를 조제하였다.

<842> 조제한 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 41 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 105를 얻었다.

<843> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<844> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 105에 나타낸 바와 같이 야생형 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 36번째의 Thr이 Met로, α-서브유닛의 148번째의 Gly가 Asp로, α-서브유닛의 204번째의 Val이 Arg로 각각 치환되어 있었다.

표 105

<845>

클론 번호	변이 개소 (α-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		야생형	변이체	야생형	변이체
No. 105	α-36번째	Thr	Met	ACG	ATG
	α-148번째	Gly	Asp	GGC	GAC
	α-204번째	Val	Arg	GTC	CGC

<846> [실시예 66] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(106)

<847> 클론 No. 47의 아미노산 변이(β-서브유닛의 10번째: Thr이 Asp)와 클론 No. 101의 아미노산 변이(β-서브유닛의 118번째: Phe가 Val; β-서브유닛의 200번째: Ala가 Glu)를 함께 갖고 있는 아미노산 치환체에 있어서도 니트릴히드라타제 활성이 보유되어 있는 것을 확인하였다.

<848> 30mL의 시험관에 10mL의 LB 액체 배지를 조제하여, 121℃·20분간 오토클레이브에 의해 멸균하였다. 상기 배지에 최종 농도가 100㎍/㎖가 되도록 암피실린을 첨가한 후, 실시예 61에서 얻어진 클론 No. 101을 1백금이 접종하여, 37℃·300rpm으로 약 20시간 배양하였다. 상기 배양액 1mL를 적당한 원심 튜브에 분취한 후, 원심분리(15000rpm × 5분)에 의해 균체를 분리하였다. 이어서, 알칼리 SDS 추출법에 의해 상기 균체로부터 플라스미드

DNA를 조제하였다.

<849> 조제한 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 48 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 106을 얻었다.

<850> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<851> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 106에 나타낸 바와 같이 야생형 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 10번째의 Thr이 Asp로, β-서브유닛의 118번째의 Phe가 Val로, β-서브유닛의 200번째의 Ala가 Glu로 각각 치환되어 있었다.

표 106

<852>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		야생형	변이체	야생형	변이체
No. 106	β-10번째	Thr	Asp	ACC	GAC
	β-118번째	Phe	Val	TTC	GTC
	β-200번째	Ala	Glu	GCC	GAA

<853> [실시예 67] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(107)

<854> 클론 No. 56의 아미노산 변이(β-서브유닛의 37번째: Phe가 Leu)와 클론 No. 100의 아미노산 변이(β-서브유닛의 108번째: Glu가 Asp; β-서브유닛의 200번째: Ala가 Glu)를 함께 갖고 있는 아미노산 치환체에 있어서도 니트릴히드라타제 활성이 보유되어 있는 것을 확인하였다.

<855> 30mL의 시험관에 10mL의 LB 액체 배지를 조제하여, 121℃·20분간 오토클레이브에 의해 멸균하였다. 상기 배지에 최종 농도가 100㎍/㎖가 되도록 암피실린을 첨가한 후, 참고예 40에서 얻어진 클론 No. 100을 1백금이 접종하여, 37℃·300rpm으로 약 20시간 배양하였다. 상기 배양액 1mL를 적당한 원심 튜브에 분취한 후, 원심분리(15000rpm × 5분)에 의해 균체를 분리하였다. 이어서, 알칼리 SDS 추출법에 의해 상기 균체로부터 플라스미드 DNA를 조제하였다.

<856> 조제한 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 57 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 107을 얻었다.

<857> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<858> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 107에 나타낸 바와 같이 야생형 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 37번째의 Phe가 Leu로, β-서브유닛의 108번째의 Glu가 Asp로, β-서브유닛의 200번째의 Ala가 Glu로 각각 치환되어 있었다.

표 107

<859>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		야생형	변이체	야생형	변이체
No. 107	β-37번째	Phe	Leu	TTC	CTC
	β-108번째	Glu	Asp	GAG	GAT
	β-200번째	Ala	Glu	GCC	GAA

<860> [실시예 68] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(108)

<861> 클론 No. 58의 아미노산 변이(β-서브유닛의 37번째: Phe가 Val)와 클론 No. 100의 아미노산 변이(β-서브유닛의 108번째: Glu가 Asp; β-서브유닛의 200번째: Ala가 Glu)를 함께 갖고 있는 아미노산 치환체에 있어서도 니트릴히드라타제 활성이 보유되어 있는 것을 확인하였다.

<862> 30mL의 시험관에 10mL의 LB 액체 배지를 조제하여, 121℃·20분간 오토클레이브에 의해 멸균하였다. 상기 배지에 최종 농도가 100㎍/㎖가 되도록 암피실린을 첨가한 후, 참고예 40에서 얻어진 클론 No. 100을 1백금이 접종하여, 37℃·300rpm으로 약 20시간 배양하였다. 상기 배양액 1mL를 적당한 원심 튜브에 분취한 후, 원심분리(15000rpm × 5분)에 의해 균체를 분리하였다. 이어서, 알칼리 SDS 추출법에 의해 상기 균체로부터 플라스미드 DNA를 조제하였다.

<863> 조제한 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 59 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 108을 얻었다.

<864> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<865> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 108에 나타낸 바와 같이 야생형 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 37번째의 Phe가 Val로, β-서브유닛의 108번째의 Glu가 Asp로, β-서브유닛의 200번째의 Ala가 Glu로 각각 치환되어 있었다.

표 108

<866>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		야생형	변이체	야생형	변이체
No. 108	β-37번째	Phe	Val	TTC	GTC
	β-108번째	Glu	Asp	GAG	GAT
	β-200번째	Ala	Glu	GCC	GAA

<867> [실시예 69] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(109)

<868> 클론 No. 63의 아미노산 변이(β-서브유닛의 41번째: Phe가 Ile)와 클론 No. 99의 아미노산 변이(β-서브유닛의 51번째: Phe가 Val; β-서브유닛의 108번째: Glu가 Asp)를 함께 갖고 있는 아미노산 치환체에 있어서도 니트릴히드라타제 활성이 보유되어 있는 것을 확인하였다.

<869> 30mL의 시험관에 10mL의 LB 액체 배지를 조제하여, 121℃·20분간 오토클레이브에 의해 멸균하였다. 상기 배지에 최종 농도가 100㎍/㎖가 되도록 암피실린을 첨가한 후, 실시예 60에서 얻어진 클론 No. 99를 1백금이 접종하여, 37℃·300rpm으로 약 20시간 배양하였다. 상기 배양액 1mL를 적당한 원심 튜브에 분취한 후, 원심분리(15000rpm × 5분)에 의해 균체를 분리하였다. 이어서, 알칼리 SDS 추출법에 의해 상기 균체로부터 플라스미드

DNA를 조제하였다.

<870> 조제한 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 64 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 109를 얻었다.

<871> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<872> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 109에 나타낸 바와 같이 야생형 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 41번째의 Phe가 Ile로, β-서브유닛의 51번째의 Phe가 Val로, β-서브유닛의 108번째의 Glu가 Asp로 각각 치환되어 있었다.

표 109

<873>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		야생형	변이체	야생형	변이체
No. 109	β-41번째	Phe	Ile	TTC	ATC
	β-51번째	Phe	Val	TTC	GTC
	β-108번째	Glu	Asp	GAG	GAT

<874> [실시예 70] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(110)

<875> 클론 No. 68의 아미노산 변이(β-서브유닛의 46번째: Met가 Lys)와 클론 No. 37의 아미노산 변이(β-서브유닛의 108번째: Glu가 Arg; β-서브유닛의 212번째: Ser가 Tyr)를 함께 갖고 있는 아미노산 치환체에 있어서도 니트릴히드라타제 활성이 보유되어 있는 것을 확인하였다.

<876> 30mL의 시험관에 10mL의 LB 액체 배지를 조제하여, 121℃·20분간 오토클레이브에 의해 멸균하였다. 상기 배지에 최종 농도가 100㎍/㎖가 되도록 암피실린을 첨가한 후, 참고예 37에서 얻어진 클론 No. 37을 1백금이 접종하여, 37℃·300rpm으로 약 20시간 배양하였다. 상기 배양액 1mL를 적당한 원심 튜브에 분취한 후, 원심분리(15000rpm × 5분)에 의해 균체를 분리하였다. 이어서, 알칼리 SDS 추출법에 의해 상기 균체로부터 플라스미드 DNA를 조제하였다.

<877> 조제한 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 69 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 110을 얻었다.

<878> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<879> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 110에 나타낸 바와 같이 야생형 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 46번째의 Met가 Lys로, β-서브유닛의 108번째의 Glu가 Arg로, β-서브유닛의 212번째의 Ser가 Tyr로 각각 치환되어 있었다.

표 110

<880>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		야생형	변이체	야생형	변이체
No. 110	β-46번째	Met	Lys	ATG	AAG
	β-108번째	Glu	Arg	GAG	CGG
	β-212번째	Ser	Tyr	TCC	TAC

<881> [실시예 71] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(111)

<882> 클론 No. 72의 아미노산 변이(β-서브유닛의 48번째: Leu가 Val)와 클론 No. 37의 아미노산 변이(β-서브유닛의 108번째: Glu가 Arg; β-서브유닛의 212번째: Ser가 Tyr)를 함께 갖고 있는 아미노산 치환체에 있어서도 니트릴히드라타제 활성이 보유되어 있는 것을 확인하였다.

<883> 30mL의 시험관에 10mL의 LB 액체 배지를 조제하여, 121℃·20분간 오토클레이브에 의해 멸균하였다. 상기 배지에 최종 농도가 100㎍/㎖가 되도록 암피실린을 첨가한 후, 참고예 37에서 얻어진 클론 No. 37을 1백금이 접종하여, 37℃·300rpm으로 약 20시간 배양하였다. 상기 배양액 1mL를 적당한 원심 튜브에 분취한 후, 원심분리(15000rpm × 5분)에 의해 균체를 분리하였다. 이어서, 알칼리 SDS 추출법에 의해 상기 균체로부터 플라스미드 DNA를 조제하였다.

<884> 조제한 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 73 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 111을 얻었다.

<885> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<886> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 111에 나타낸 바와 같이 야생형 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 48번째의 Leu가 Val로, β-서브유닛의 108번째의 Glu가 Arg로, β-서브유닛의 212번째의 Ser가 Tyr로 각각 치환되어 있었다.

표 111

<887>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		야생형	변이체	야생형	변이체
No. 111	β-48번째	Leu	Val	CTG	GTG
	β-108번째	Glu	Arg	GAG	CGG
	β-212번째	Ser	Tyr	TCC	TAC

<888> [실시예 72] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(112)

<889> 클론 No. 85의 아미노산 변이(β-서브유닛의 127번째: Leu가 Ser)와 클론 No. 102의 아미노산 변이(β-서브유닛의 160번째: Arg가 Trp; β-서브유닛의 186번째: Leu가 Arg)를 함께 갖고 있는 아미노산 치환체에 있어서도 니트릴히드라타제 활성이 보유되어 있는 것을 확인하였다.

<890> 30mL의 시험관에 10mL의 LB 액체 배지를 조제하여, 121℃·20분간 오토클레이브에 의해 멸균하였다. 상기 배지에 최종 농도가 100㎍/㎖가 되도록 암피실린을 첨가한 후, 실시예 62에서 얻어진 클론 No. 102를 1백금이 접종하여, 37℃·300rpm으로 약 20시간 배양하였다. 상기 배양액 1mL를 적당한 원심 튜브에 분취한 후, 원심분리(15000rpm × 5분)에 의해 균체를 분리하였다. 이어서, 알칼리 SDS 추출법에 의해 상기 균체로부터 플라스미드

DNA를 조제하였다.

<891> 조제한 플라스미드 DNA 10ng을 각각 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 No. 1은 서열목록의 서열번호: 86 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호: 8에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(55℃) 30초, 신장 반응(72℃) 120초의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 No. 2는 MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호: 9에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호: 10에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 No. 1과 동일한 조작에 의해 행하였다. PCR 반응 No. 1 및 No. 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이후, 실시예 1과 완전히 동일한 조작에 의해, 형질전환체 No. 112를 얻었다.

<892> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<893> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 112에 나타낸 바와 같이 야생형 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 127번째의 Leu가 Ser로, β-서브유닛의 160번째의 Arg가 Trp로, β-서브유닛의 186번째의 Leu가 Arg로 각각 치환되어 있었다.

표 112

<894>

클론 번호	변이 개소 (β-서브유닛 내)	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		야생형	변이체	야생형	변이체
No. 112	β-127번째	Leu	Ser	CTG	TCG
	β-160번째	Arg	Trp	CGG	TGG
	β-186번째	Leu	Arg	CTG	CGG

<895> [실시예 73] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(113)

<896> 클론 No. 34의 아미노산 변이와 클론 No. 110의 아미노산 변이를 함께 갖고 있는 아미노산 치환체에 있어서도 니트릴히드라타제 활성이 보유되어 있는 것을 확인하였다.

<897> 30mL의 시험관에 10mL의 LB 액체 배지를 조제하여, 121℃·20분간 오토클레이브에 의해 멸균하였다. 상기 배지에 최종 농도가 100㎍/㎖가 되도록 암피실린을 첨가한 후, 참고예 34에서 얻어진 클론 No. 34 및 실시예 70에서 얻어진 클론 No. 110을 1백금이 접종하여, 37℃·300rpm으로 약 20시간 배양하였다. 상기 배양액 1mL를 적당한 원심 튜브에 분취한 후, 원심분리(15000rpm × 5분)에 의해 각각의 균체를 분리하였다. 이어서, 알칼리 SDS 추출법에 의해 상기 균체로부터 클론 No. 34 및 클론 No. 110의 플라스미드 DNA를 각각 조제하였다.

<898> 클론 No. 110의 플라스미드 DNA를 EcoRI 및 NotI에 의해 절단한 후, 아가로스 겔 전기영동(시그마사 제조, 타입 VII 저융점 아가로스 사용; 아가로스 농도 1.0%)을 행하여, 아가로스 겔로부터 약 770kbp의 DNA 단편을 잘라내었다. 마찬가지로, 클론 No. 34의 플라스미드 DNA를 EcoRI 및 NotI에 의해 절단한 후, 아가로스 겔 전기영동(시그마사 제조, 타입 VII 저융점 아가로스 사용; 아가로스 농도 0.7%)을 행하여, 아가로스 겔로부터 약 3.8kbp의 DNA 단편을 잘라내었다. 잘라낸 양 아가로스편(약 0.1g)을 미세하게 분쇄하여 1mL의 TE 용액에 각각 현탁한 후, 55℃에서 1시간 보온하여 아가로스를 완전하게 융해시켰다. 이 융해액에 대해서 페놀/클로로포름 추출과 에탄올 침전을 행하여 각 DNA 단편을 정제하여, 최종적으로 10㎕의 TE에 용해시켰다.

<899> 이와 같이 하여 얻어진 클론 No. 110 유래의 약 770kbp의 DNA 단편과 클론 No. 34 유래의 약 3.8kbp의 DNA 단편을 DNA 라이게이션 키트(타카라 주조사 제조)를 이용하여 연결시켜 플라스미드를 구축하였다. 상기 플라스미드에 의해 대장균 HB101의 컴피턴트 세포(competent cell; 토요 방적사 제조)를 형질전환하여, 형질전환체 No. 113을 얻었다.

<900> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<901> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 113에 나타낸 바와 같이 야생형 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 6번째의 Leu가 Thr로, α-서브유닛

의 19번째의 Ala가 Val로, α-서브유닛의 126번째의 Phe가 Tyr로, β-서브유닛의 46번째의 Met가 Lys로, β-서브유닛의 108번째의 Glu가 Arg로, β-서브유닛의 212번째의 Ser가 Tyr로 각각 치환되어 있었다.

표 113

<902>

클론 번호	변이 개소	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		야생형	변이체	야생형	변이체
No. 113	α-6번째	Leu	Thr	CTG	ACG
	α-19번째	Ala	Val	GCG	GTG
	α-126번째	Phe	Tyr	TTC	TAC
	β-46번째	Met	Lys	ATG	AAG
	β-108번째	Glu	Arg	GAG	CGG
	β-212번째	Ser	Tyr	TCC	TAC

<903> [실시예 74] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(114)

<904> 클론 No. 34의 아미노산 변이와 클론 No. 111의 아미노산 변이를 함께 갖고 있는 아미노산 치환체에 있어서도 니트릴히드라타제 활성이 보유되어 있는 것을 확인하였다.

<905> 30mL의 시험관에 10mL의 LB 액체 배지를 조제하여, 121℃·20분간 오토클레이브에 의해 멸균하였다. 상기 배지에 최종 농도가 100㎍/㎖가 되도록 암피실린을 첨가한 후, 참고예 34에서 얻어진 클론 No. 34 및 실시예 71에서 얻어진 클론 No. 111을 1백금이 접종하여, 37℃·300rpm으로 약 20시간 배양하였다. 상기 배양액 1mL를 적당한 원심 튜브에 분취한 후, 원심분리(15000rpm × 5분)에 의해 각각의 균체를 분리하였다. 이어서, 알칼리 SDS 추출법에 의해 상기 균체로부터 클론 No. 34 및 클론 No. 111의 플라스미드 DNA를 각각 조제하였다.

<906> 클론 No. 111의 플라스미드 DNA를 EcoRI 및 NotI에 의해 절단한 후, 아가로스 겔 전기영동(시그마사 제조, 타입 VII 저융점 아가로스 사용; 아가로스 농도 1.0%)을 행하여, 아가로스 겔로부터 약 770kbp의 DNA 단편을 잘라내었다. 마찬가지로, 클론 No. 34의 플라스미드 DNA를 EcoRI 및 NotI에 의해 절단한 후, 아가로스 겔 전기영동(시그마사 제조, 타입 VII 저융점 아가로스 사용; 아가로스 농도 0.7%)을 행하여, 아가로스 겔로부터 약 3.8kbp의 DNA 단편을 잘라내었다. 잘라낸 양 아가로스편(약 0.1g)을 미세하게 분쇄하여 1mL의 TE 용액에 각각 현탁한 후, 55℃에서 1시간 보온하여 아가로스를 완전하게 융해시켰다. 이 융해액에 대해서 페놀/클로로포름 추출과 에탄올 침전을 행하여 각 DNA 단편을 정제하여, 최종적으로 10㎕의 TE에 용해시켰다.

<907> 이와 같이 하여 얻어진 클론 No. 111 유래의 약 770kbp의 DNA 단편과 클론 No. 34 유래의 약 3.8kbp의 DNA 단편을 DNA 라이게이션 키트(타카라 주조사 제조)를 이용하여 연결시켜 플라스미드를 구축하였다. 상기 플라스미드에 의해 대장균 HB101의 캄피턴트 세포(토요 방적사 제조)를 형질전환하여, 형질전환체 No. 114를 얻었다.

<908> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<909> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 114에 나타낸 바와 같이 야생형 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 6번째의 Leu가 Thr로, α-서브유닛의 19번째의 Ala가 Val로, α-서브유닛의 126번째의 Phe가 Tyr로, β-서브유닛의 48번째의 Leu가 Val로, β-서브유닛의 108번째의 Glu가 Arg로, β-서브유닛의 212번째의 Ser가 Tyr로 각각 치환되어 있었다.

표 114

<910>

클론 번호	변이 개소	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		야생형	변이체	야생형	변이체
No. 114	α-6번째	Leu	Thr	CTG	ACG
	α-19번째	Ala	Val	GCG	GTG
	α-126번째	Phe	Tyr	TTC	TAC
	β-48번째	Leu	Val	CTG	GTG
	β-108번째	Glu	Arg	GAG	CGG
	β-212번째	Ser	Tyr	TCC	TAC

<911> [실시예 75] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(115)

<912> 클론 No. 35의 아미노산 변이와 클론 No. 112의 아미노산 변이를 함께 갖고 있는 아미노산 치환체에 있어서도 니트릴히드라타제 활성이 보유되어 있는 것을 확인하였다.

<913> 30mL의 시험관에 10mL의 LB 액체 배지를 조제하여, 121℃·20분간 오토클레이브에 의해 멸균하였다. 상기 배지에 최종 농도가 100㎍/㎖가 되도록 암피실린을 첨가한 후, 참고예 35에서 얻어진 클론 No. 35 및 실시예 72에서 얻어진 클론 No. 112를 1백금이 접종하여, 37℃·300rpm으로 약 20시간 배양하였다. 상기 배양액 1mL를 적당한 원심 튜브에 분취한 후, 원심분리(15000rpm × 5분)에 의해 각각의 균체를 분리하였다. 이어서, 알칼리 SDS 추출법에 의해 상기 균체로부터 클론 No. 35 및 클론 No. 112의 플라스미드 DNA를 각각 조제하였다.

<914> 클론 No. 112의 플라스미드 DNA를 EcoRI 및 NotI에 의해 절단한 후, 아가로스 겔 전기영동(시그마사 제조, 타입 VII 저융점 아가로스 사용; 아가로스 농도 1.0%)을 행하여, 아가로스 겔로부터 약 770kbp의 DNA 단편을 잘라내었다. 마찬가지로, 클론 No. 35의 플라스미드 DNA를 EcoRI 및 NotI에 의해 절단한 후, 아가로스 겔 전기영동(시그마사 제조, 타입 VII 저융점 아가로스 사용; 아가로스 농도 0.7%)을 행하여, 아가로스 겔로부터 약 3.8kbp의 DNA 단편을 잘라내었다. 잘라낸 양 아가로스편(약 0.1g)을 미세하게 분쇄하여 1mL의 TE 용액에 각각 현탁한 후, 55℃에서 1시간 보온하여 아가로스를 완전하게 융해시켰다. 이 융해액에 대해서 페놀/클로로포름 추출과 에탄올 침전을 행하여 각 DNA 단편을 정제하여, 최종적으로 10㎕의 TE에 용해시켰다.

<915> 이와 같이 하여 얻어진 클론 No. 112 유래의 약 770kbp의 DNA 단편과 클론 No. 35 유래의 약 3.8kbp의 DNA 단편을 DNA 라이게이션 키트(타카라 주조사 제조)를 이용하여 연결시켜 플라스미드를 구축하였다. 상기 플라스미드에 의해 대장균 HB101의 컴피턴트 세포(토요 방적사 제조)를 형질전환하여, 형질전환체 No. 115를 얻었다.

<916> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<917> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 115에 나타낸 바와 같이 야생형 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 6번째의 Leu가 Ala로, α-서브유닛의 19번째의 Ala가 Val로, α-서브유닛의 126번째의 Phe가 Tyr로, β-서브유닛의 127번째의 Leu가 Ser로, β-서브유닛의 160번째의 Arg가 Trp로, β-서브유닛의 186번째의 Leu가 Arg로 각각 치환되어 있었다.

표 115

<918>

클론 번호	변이 개소	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		야생형	변이체	야생형	변이체
No. 115	α-6번째	Leu	Ala	CTG	GCG
	α-19번째	Ala	Val	GCG	GTG
	α-126번째	Phe	Tyr	TTC	TAC
	β-127번째	Leu	Ser	CTG	TCG
	β-160번째	Arg	Trp	CGG	TGG
	β-186번째	Leu	Arg	CTG	CGG

<919> [실시예 76] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(116)

<920> 클론 No. 103의 아미노산 변이와 클론 No. 106의 아미노산 변이를 함께 갖고 있는 아미노산 치환체에 있어서도 니트릴히드라타제 활성이 보유되어 있는 것을 확인하였다.

<921> 30mL의 시험관에 10mL의 LB 액체 배지를 조제하여, 121℃·20분간 오토클레이브에 의해 멸균하였다. 상기 배지에 최종 농도가 100㎍/㎖가 되도록 암피실린을 첨가한 후, 실시예 63에서 얻어진 클론 No. 103 및 실시예 66에서 얻어진 클론 No. 106을 1백금이 접종하여, 37℃·300rpm으로 약 20시간 배양하였다. 상기 배양액 1mL를 적당한 원심 튜브에 분취한 후, 원심분리(15000rpm × 5분)에 의해 각각의 균체를 분리하였다. 이어서, 알칼리 SDS 추출법에 의해 상기 균체로부터 클론 No. 103 및 클론 No. 106의 플라스미드 DNA를 각각 조제하였다.

<922> 클론 No. 106의 플라스미드 DNA를 EcoRI 및 NotI에 의해 절단한 후, 아가로스 겔 전기영동(시그마사 제조, 타입 VII 저융점 아가로스 사용; 아가로스 농도 1.0%)을 행하여, 아가로스 겔로부터 약 770kbp의 DNA 단편을 잘라내었다. 마찬가지로, 클론 No. 103의 플라스미드 DNA를 EcoRI 및 NotI에 의해 절단한 후, 아가로스 겔 전기영동(시그마사 제조, 타입 VII 저융점 아가로스 사용; 아가로스 농도 0.7%)을 행하여, 아가로스 겔로부터 약

3.8kbp의 DNA 단편을 잘라내었다. 잘라낸 양 아가로스편(약 0.1g)을 미세하게 분쇄하여 1mL의 TE 용액에 각각 현탁한 후, 55℃에서 1시간 보온하여 아가로스를 완전하게 융해시켰다. 이 융해액에 대해서 페놀/클로로포름 추출과 에탄올 침전을 행하여 각 DNA 단편을 정제하여, 최종적으로 10㎕의 TE에 용해시켰다.

<923> 이와 같이 하여 얻어진 클론 No. 106 유래의 약 770kbp의 DNA 단편과 클론 No. 103 유래의 약 3.8kbp의 DNA 단편을 DNA 라이게이션 키트(타카라 주조사 제조)를 이용하여 연결시켜 플라스미드를 구축하였다. 상기 플라스미드에 의해 대장균 HB101의 컴피턴트 세포(토요 방적사 제조)를 형질전환하여, 형질전환체 No. 116을 얻었다.

<924> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<925> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 116에 나타낸 바와 같이 야생형 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 6번째의 Leu가 Thr로, α-서브유닛의 36번째의 Thr이 Met로, α-서브유닛의 126번째의 Phe가 Tyr에, β-서브유닛의 10번째의 Thr이 Asp로, β-서브유닛의 118번째의 Phe가 Val로, β-서브유닛의 200번째의 Ala가 Glu로 각각 치환되어 있었다.

표 116

<926>

클론 번호	변이 개소	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		야생형	변이체	야생형	변이체
No. 116	α-6번째	Leu	Thr	CTG	ACG
	α-36번째	Thr	Met	ACG	ATG
	α-126번째	Phe	Tyr	TTC	TAC
	β-10번째	Thr	Asp	ACC	GAC
	β-118번째	Phe	Val	TTC	GTC
	β-200번째	Ala	Glu	GCC	GAA

<927> [실시예 77] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(117)

<928> 클론 No. 104의 아미노산 변이와 클론 No. 107의 아미노산 변이를 함께 갖고 있는 아미노산 치환체에 있어서도 니트릴히드라타제 활성이 보유되어 있는 것을 확인하였다.

<929> 30mL의 시험관에 10mL의 LB 액체 배지를 조제하여, 121℃·20분간 오토클레이브에 의해 멸균하였다. 상기 배지에 최종 농도가 100㎍/㎖가 되도록 암피실린을 첨가한 후, 실시예 64에서 얻어진 클론 No. 104 및 실시예 67에서 얻어진 클론 No. 107을 1백금이 접종하여, 37℃·300rpm으로 약 20시간 배양하였다. 상기 배양액 1mL를 적당한 원심 튜브에 분취한 후, 원심분리(15000rpm × 5분)에 의해 각각의 균체를 분리하였다. 이어서, 알칼리 SDS 추출법에 의해 상기 균체로부터 클론 No. 104 및 클론 No. 107의 플라스미드 DNA를 각각 조제하였다.

<930> 클론 No. 107의 플라스미드 DNA를 EcoRI 및 NotI에 의해 절단한 후, 아가로스 겔 전기영동(시그마사 제조, 타입 VII 저융점 아가로스 사용; 아가로스 농도 1.0%)을 행하여, 아가로스 겔로부터 약 770kbp의 DNA 단편을 잘라내었다. 마찬가지로, 클론 No. 104의 플라스미드 DNA를 EcoRI 및 NotI에 의해 절단한 후, 아가로스 겔 전기영동(시그마사 제조, 타입 VII 저융점 아가로스 사용; 아가로스 농도 0.7%)을 행하여, 아가로스 겔로부터 약 3.8kbp의 DNA 단편을 잘라내었다. 잘라낸 양 아가로스편(약 0.1g)을 미세하게 분쇄하여 1mL의 TE 용액에 각각 현탁한 후, 55℃에서 1시간 보온하여 아가로스를 완전하게 융해시켰다. 이 융해액에 대해서 페놀/클로로포름 추출과 에탄올 침전을 행하여 각 DNA 단편을 정제하여, 최종적으로 10㎕의 TE에 용해시켰다.

<931> 이와 같이 하여 얻어진 클론 No. 107 유래의 약 770kbp의 DNA 단편과 클론 No. 104 유래의 약 3.8kbp의 DNA 단편을 DNA 라이게이션 키트(타카라 주조사 제조)를 이용하여 연결시켜 플라스미드를 구축하였다. 상기 플라스미드에 의해 대장균 HB101의 컴피턴트 세포(토요 방적사 제조)를 형질전환하여, 형질전환체 No. 117을 얻었다.

<932> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<933> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 117에 나타낸 바와 같이 야생형 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 19번째의 Ala가 Val로, α-서브유닛의 71번째의 Arg가 His로, α-서브유닛의 126번째의 Phe가 Tyr로, β-서브유닛의 37번째의 Phe가 Leu로, β-

서브유닛의 108번째의 Glu가 Asp로, β-서브유닛의 200번째의 Ala가 Glu로 각각 치환되어 있었다.

표 117

<934>

클론 번호	변이 개소	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		야생형	변이체	야생형	변이체
No. 117	α-19번째	Ala	Val	GCG	GTG
	α-71번째	Arg	His	CGT	CAT
	α-126번째	Phe	Tyr	TTC	TAC
	β-37번째	Phe	Leu	TTC	CTC
	β-108번째	Glu	Asp	GAG	GAT
	β-200번째	Ala	Glu	GCC	GAA

<935> [실시예 78] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(118)

<936> 클론 No. 104의 아미노산 변이와 클론 No. 108의 아미노산 변이를 함께 갖고 있는 아미노산 치환체에 있어서도 니트릴히드라타제 활성이 보유되어 있는 것을 확인하였다.

<937> 30mL의 시험관에 10mL의 LB 액체 배지를 조제하여, 121℃·20분간 오토클레이브에 의해 멸균하였다. 상기 배지에 최종 농도가 100㎍/㎖가 되도록 암피실린을 첨가한 후, 실시예 64에서 얻어진 클론 No. 104 및 실시예 68에서 얻어진 클론 No. 108을 1백금이 접종하여, 37℃·300rpm으로 약 20시간 배양하였다. 상기 배양액 1mL를 적당한 원심 튜브에 분취한 후, 원심분리(15000rpm × 5분)에 의해 각각의 균체를 분리하였다. 이어서, 알칼리 SDS 추출법에 의해 상기 균체로부터 클론 No. 104 및 클론 No. 108의 플라스미드 DNA를 각각 조제하였다.

<938> 클론 No. 108의 플라스미드 DNA를 EcoRI 및 NotI에 의해 절단한 후, 아가로스 겔 전기영동(시그마사 제조, 타입 VII 저융점 아가로스 사용; 아가로스 농도 1.0%)을 행하여, 아가로스 겔로부터 약 770kbp의 DNA 단편을 잘라내었다. 마찬가지로, 클론 No. 104의 플라스미드 DNA를 EcoRI 및 NotI에 의해 절단한 후, 아가로스 겔 전기영동(시그마사 제조, 타입 VII 저융점 아가로스 사용; 아가로스 농도 0.7%)을 행하여, 아가로스 겔로부터 약 3.8kbp의 DNA 단편을 잘라내었다. 잘라낸 양 아가로스편(약 0.1g)을 미세하게 분쇄하여 1mL의 TE 용액에 각각 현탁한 후, 55℃에서 1시간 보온하여 아가로스를 완전하게 융해시켰다. 이 융해액에 대해서 페놀/클로로포름 추출과 에탄올 침전을 행하여 각 DNA 단편을 정제하여, 최종적으로 10㎕의 TE에 용해시켰다.

<939> 이와 같이 하여 얻어진 클론 No. 108 유래의 약 770kbp의 DNA 단편과 클론 No. 104 유래의 약 3.8kbp의 DNA 단편을 DNA 라이게이션 키트(타카라 주조사 제조)를 이용하여 연결시켜 플라스미드를 구축하였다. 상기 플라스미드에 의해 대장균 HB101의 캄피턴트 세포(토요 방적사 제조)를 형질전환하여, 형질전환체 No. 118을 얻었다.

<940> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<941> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 118에 나타낸 바와 같이 야생형 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 19번째의 Ala가 Val로, α-서브유닛의 71번째의 Arg가 His로, α-서브유닛의 126번째의 Phe가 Tyr로, β-서브유닛의 37번째의 Phe가 Val로, β-서브유닛의 108번째의 Glu가 Asp로, β-서브유닛의 200번째의 Ala가 Glu로 각각 치환되어 있었다.

표 118

<942>

클론 번호	변이 개소	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		야생형	변이체	야생형	변이체
No. 118	α-19번째	Ala	Val	GCG	GTG
	α-71번째	Arg	His	CGT	CAT
	α-126번째	Phe	Tyr	TTC	TAC
	β-37번째	Phe	Val	TTC	GTC
	β-108번째	Glu	Asp	GAG	GAT
	β-200번째	Ala	Glu	GCC	GAA

<943> [실시예 79] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(119)

<944> 클론 No. 105의 아미노산 변이와 클론 No. 109의 아미노산 변이를 함께 갖고 있는 아미노산 치환체에 있어서도 니트릴히드라타제 활성이 보유되어 있는 것을 확인하였다.

<945> 30mL의 시험관에 10mL의 LB 액체 배지를 조제하여, 121℃·20분간 오토클레이브에 의해 멸균하였다. 상기 배지에 최종 농도가 100㎍/㎖가 되도록 암피실린을 첨가한 후, 실시예 65에서 얻어진 클론 No. 105 및 실시예 69에서 얻어진 클론 No. 109를 1백금이 접종하여, 37℃·300rpm으로 약 20시간 배양하였다. 상기 배양액 1mL를 적당한 원심 튜브에 분취한 후, 원심분리(15000rpm × 5분)에 의해 각각의 균체를 분리하였다. 이어서, 알칼리 SDS 추출법에 의해 상기 균체로부터 클론 No. 105 및 클론 No. 109의 플라스미드 DNA를 각각 조제하였다.

<946> 클론 No. 109의 플라스미드 DNA를 EcoRI 및 NotI에 의해 절단한 후, 아가로스 겔 전기영동(시그마사 제조, 타입 VII 저융점 아가로스 사용; 아가로스 농도 1.0%)을 행하여, 아가로스 겔로부터 약 770kbp의 DNA 단편을 잘라내었다. 마찬가지로, 클론 No. 105의 플라스미드 DNA를 EcoRI 및 NotI에 의해 절단한 후, 아가로스 겔 전기영동(시그마사 제조, 타입 VII 저융점 아가로스 사용; 아가로스 농도 0.7%)을 행하여, 아가로스 겔로부터 약 3.8kbp의 DNA 단편을 잘라내었다. 잘라낸 양 아가로스편(약 0.1g)을 미세하게 분쇄하여 1mL의 TE 용액에 각각 현탁한 후, 55℃에서 1시간 보온하여 아가로스를 완전하게 융해시켰다. 이 융해액에 대해서 페놀/클로로포름 추출과 에탄올 침전을 행하여 각 DNA 단편을 정제하여, 최종적으로 10㎕의 TE에 용해시켰다.

<947> 이와 같이 하여 얻어진 클론 No. 109 유래의 약 770kbp의 DNA 단편과 클론 No. 105 유래의 약 3.8kbp의 DNA 단편을 DNA 라이게이션 키트(타카라 주조사 제조)를 이용하여 연결시켜 플라스미드를 구축하였다. 상기 플라스미드에 의해 대장균 HB101의 컴피턴트 세포(토요 방적사 제조)를 형질전환하여, 형질전환체 No. 119를 얻었다.

<948> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<949> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 119에 나타낸 바와 같이 야생형 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 36번째의 Thr이 Met로, α-서브유닛의 148번째의 Gly가 Asp로, α-서브유닛의 204번째의 Val이 Arg로, β-서브유닛의 41번째의 Phe가 Ile로, β-서브유닛의 51번째의 Phe가 Val로, β-서브유닛의 108번째의 Glu가 Asp로 각각 치환되어 있었다.

표 119

<950>

클론 번호	변이 개소	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		야생형	변이체	야생형	변이체
No. 119	α-36번째	Thr	Met	ACG	ATG
	α-148번째	Gly	Asp	GGC	GAC
	α-204번째	Val	Arg	GTC	CGC
	β-41번째	Phe	Ile	TTC	ATC
	β-51번째	Phe	Val	TTC	GTC
	β-108번째	Glu	Asp	GAG	GAT

<951> [실시예 80] 니트릴히드라타제 활성을 보유한 아미노산 치환체의 취득(120)

<952> 클론 No. 98의 아미노산 변이와 클론 No. 100의 아미노산 변이를 함께 갖고 있는 아미노산 치환체에 있어서도 니트릴히드라타제 활성이 보유되어 있는 것을 확인하였다.

<953> 30mL의 시험관에 10mL의 LB 액체 배지를 조제하여, 121℃·20분간 오토클레이브에 의해 멸균하였다. 상기 배지에 최종 농도가 100㎍/㎖가 되도록 암피실린을 첨가한 후, 실시예 59에서 얻어진 클론 No. 98 및 참고예 40에서 얻어진 클론 No. 100을 1백금이 접종하여, 37℃·300rpm으로 약 20시간 배양하였다. 상기 배양액 1mL를 적당한 원심 튜브에 분취한 후, 원심분리(15000rpm × 5분)에 의해 각각의 균체를 분리하였다. 이어서, 알칼리 SDS 추출법에 의해 상기 균체로부터 클론 No. 98 및 클론 No. 100의 플라스미드 DNA를 각각 조제하였다.

<954> 클론 No. 100의 플라스미드 DNA를 EcoRI 및 NotI에 의해 절단한 후, 아가로스 겔 전기영동(시그마사 제조, 타입 VII 저융점 아가로스 사용; 아가로스 농도 1.0%)을 행하여, 아가로스 겔로부터 약 770kbp의 DNA 단편을 잘라내었다. 마찬가지로, 클론 No. 98의 플라스미드 DNA를 EcoRI 및 NotI에 의해 절단한 후, 아가로스 겔 전기영동(시그마사 제조, 타입 VII 저융점 아가로스 사용; 아가로스 농도 0.7%)을 행하여, 아가로스 겔로부터 약 3.8kbp의

DNA 단편을 잘라내었다. 잘라낸 양 아가로스편(약 0.1g)을 미세하게 분쇄하여 1mL의 TE 용액에 각각 현탁한 후, 55℃에서 1시간 보온하여 아가로스를 완전하게 융해시켰다. 이 융해액에 대해서 페놀/클로로포름 추출과 에탄올 침전을 행하여 각 DNA 단편을 정제하여, 최종적으로 10㎕의 TE에 용해시켰다.

<955> 이와 같이 하여 얻어진 클론 No. 100 유래의 약 770kbp의 DNA 단편과 클론 No. 98 유래의 약 3.8kbp의 DNA 단편을 DNA 라이게이션 키트(타카라 주조사 제조)를 이용하여 연결시켜 플라스미드를 구축하였다. 상기 플라스미드에 의해 대장균 HB101의 캄피턴트 세포(토요 방적사 제조)를 형질전환하여, 형질전환체 No. 120을 얻었다.

<956> 다음에, 참고예 1과 동일한 방법에 의해 첨가율 및 선택률을 구한 바, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<957> 또한, 상기 균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하였다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 니트릴히드라타제 유전자 부분의 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 표 120에 나타낸 바와 같이 야생형 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 148번째의 Gly가 Asp로, α-서브유닛의 204번째의 Val이 Arg로, β-서브유닛의 108번째의 Glu가 Asp로, β-서브유닛의 200번째의 Ala가 Glu로 각각 치환되어 있었다.

표 120

<958>

클론 번호	변이 개소	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		야생형	변이체	야생형	변이체
No. 120	α-148번째	Gly	Asp	GGC	GAC
	α-204번째	Val	Arg	GTC	CGC
	β-108번째	Glu	Asp	GAG	GAT
	β-200번째	Ala	Glu	GCC	GAA

<959> [실시예 81] 로도코커스 로도크로우스 J-1주로부터의 게놈 DNA 조제

<960> 500mL의 배플 부착형 삼각 플라스크에 하기 조성의 배지 100mL를 조제하여, 121℃·20분간 오토클레이브에 의해 멸균하였다.

<961> 배지 조성;

<962> 글루코스: 10.0g/L, 인산이수소일칼륨: 0.5g/L, 인산일수소이칼륨: 0.5g/L, 황산마그네슘·칠수화물: 0.5g/L, 효모 추출물: 1.0g/L, 펩톤: 7.5g/L, 요소: 7.5g/L, 염화코발트·육수화물: 10.0mg/L, pH 7.2

<963> 상기 배지에 특허 문헌 1 기재의 로도코커스 로도크로우스 J-1주(FERMkbp-1478로서, 상기 기탁 기관에 특허 수속 상의 미생물의 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트 조약에 의거하여 기탁되어, 만인에 대해 청구에 의해 분양된다)를 1백금이 접종하여, 30℃·130rpm으로 72시간 배양하였다. 원심분리(15000G × 5분간)에 의해 균체만을 배양액에서 분리하고, 이어서, 50mL의 생리 식염수에 상기 균체를 재현탁한 후에, 한번 더 원심분리를 행하여 습균체(濕菌體)를 얻었다.

<964> 상기에서 얻은 습균체 2g에 0.15M의 NaCl를 함유하는 50mM의 EDTA·2Na 수용액(pH8.0)을 40mL 가해 균체를 현탁시켜, 90℃에서 10분간 비등 처리하였다. 이 처리액을 37℃까지 냉각한 후에, 난백 리소자임을 100mg 가해 37℃에서 1시간 보온하였다. 다음에 20000U/mg의 자이몰리라제(zymolylase)를 30mg 가해 37℃에서 1시간 보온하였다. 이어서, 20U/mg의 프로테이나제 K를 5mg 가해 37℃에서 1시간 보온하였다. 또한, 10% SDS 용액을 2mL 첨가하여 65℃에서 1시간 보온한 후, 즉시 페놀/클로로포름 추출을 행하였다. 우선, TE(1mM의 EDTA·2Na를 함유하는 10mM의 트리스염산 수용액; pH8.0)로 포화시킨 페놀액 42mL를 가해 서서히 교반하였다. 원심분리(3000rpm·10분간)에 의해 수상과 유기상을 분리하여, 수상만을 분취하였다. 상기 수상에 상기 TE 포화 페놀액 21mL와 클로로포름 21mL를 가해 다시 서서히 교반한 후, 원심분리(3000rpm·10분간)에 의해 수상과 유기상을 한번 더 분리하여, 수상만을 재분취하였다. 상기 수상에 클로로포름 42mL를 가해 다시 서서히 교반한 후, 원심분리(3000rpm·10분간)에 의해 수상과 유기상을 한번 더 분리하여, 수상만을 분취하였다. 상기 수상에 1.1M의 NaCl를 함유하는 TE 용액 4mL와 에탄올 92mL를 가해 잠시 실온에서 방치한 후, 석출한 실모양의 DNA를 유리 막대를 이용하여 권취하였다. 70%·80%·90%의 에탄올 수용액으로 순차 탈수를 행한 후에 공기 건조시킨 상기 DNA를 40mL의 TE 용액에 재용해시켰다. RNaseA를 30㎍ 가해 37℃에서 1시간 보온한 후, 제한효소 BamHI로 부분 절단하였다. 페놀 추출/클로로포름 추출 및 에탄올 침전에 의해 부분 절단된 상기 DNA를 재정제하여, 최종적으로 1.0㎍/㎖가 되도록 TE 용액에 용해시켰다.

<965> [실시예 82] PCR를 이용한 로도코커스 로도크로우스 J-1주 게놈 DNA로부터의 니트릴히드라타제 유전자의 조제

<966> 특허 문헌 2 및 비특허 문헌 1에 밝혀져 있는 니트릴히드라타제 유전자의 염기 서열에 의거하여, 서열목록의 서열번호 105 및 106 기재의 프라이머를 합성하였다. 실시예 81에서 조제한 부분 절단된 염색체 DNA 3㎍을 주형으로 하여, PCR를 행하였다. PCR 반응에서는 각 프라이머를 각각 200ng과 KOD 폴리머라제(토요 방적사 제조)를 1U를 함유하는 전체량 50㎕의 계에서, 열변성(98℃) 15초, 어닐링(58℃) 15초, 신장 반응(68℃) 2분간의 사이클을 40회 반복하였다. PCR 반응의 종료액을 아가로스 겔 전기영동(시그마사 제조, 타입 VII 저융점 아가로스 사용; 아가로스 농도 0.8중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 약 1.3kbp의 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다.

<967> 이어서, 아가로스 겔로부터 약 1.3kbp의 DNA 단편만을 잘라내어, 이 아가로스편(약 0.1g)을 미세하게 분쇄하여 1mL의 TE 용액에 현탁한 후, 55℃에서 1시간 보온하여 아가로스를 완전하게 융해시켰다. 이 융해액에 대해서 페놀/클로로포름 추출과 에탄올 침전을 행하였다. 우선, TE(1mM의 EDTA·2Na를 함유하는 10mM의 트리스염산 수용액; pH8.0)로 포화시킨 페놀액 1mL를 가해 서서히 교반하였다. 원심분리(3000rpm·10분간)에 의해 수상과 유기상을 분리하여, 수상만을 분취하였다. 이 조작을 3회 반복한 후, 얻어진 수상에 상기 TE 포화 페놀액 0.4mL와 클로로포름 0.4mL를 가해 다시 서서히 교반한 후, 원심분리(3000rpm·10분간)에 의해 수상과 유기상을 한번 더 분리하여, 수상만을 재분취하였다. 상기 수상에 클로로포름 0.8mL를 가해 다시 서서히 교반한 후, 원심분리(3000rpm·10분간)에 의해 수상과 유기상을 한번 더 분리하여, 수상만을 분취하였다. 상기 수상에 1.1M의 NaCl를 함유하는 TE 용액 80㎕와 에탄올 1.7mL를 가해 -80℃에서 30분간 방치한 후, 원심분리(15000rpm·20분간·4℃)에 의해 DNA 단편의 침전을 회수하였다. 상기 DNA 단편을 공기 건조 후, 최종적으로 10㎕의 TE에 용해시켰다.

<968> 정제한 약 1.3kbp의 증폭 DNA 단편을 제한효소 EcoRI 및 ScaI에 의해 절단한 후, 아가로스 겔 전기영동(시그마사 제조, 타입 VII 저융점 아가로스 사용; 아가로스 농도 0.8중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 약 1.3kbp의 DNA의 존재를 확인할 수 있었다. 아가로스 겔로부터 상기 약 1.3kbp의 DNA 단편을 잘라내어, 이 아가로스편(약 0.1g)을 미세하게 분쇄하여 1mL의 TE 용액에 현탁한 후, 55℃에서 1시간 보온하여 아가로스를 완전하게 융해시켰다. 이 융해액에 대해서 페놀/클로로포름 추출과 에탄올 침전을 행하였다. 우선, TE(1mM의 EDTA·2Na를 함유하는 10mM의 트리스염산 수용액; pH8.0)로 포화시킨 페놀액 1mL를 가해 서서히 교반하였다. 원심분리(3000rpm·10분간)에 의해 수상과 유기상을 분리하여, 수상만을 분취하였다. 이 조작을 3회 반복한 후, 얻어진 수상에 상기 TE 포화 페놀액 0.4mL와 클로로포름 0.4mL를 가해 다시 서서히 교반한 후, 원심분리(3000rpm·10분간)에 의해 수상과 유기상을 한번 더 분리하여, 수상만을 재분취하였다. 상기 수상에 클로로포름 0.8mL를 가해 다시 서서히 교반한 후, 원심분리(3000rpm·10분간)에 의해 수상과 유기상을 한번 더 분리하여, 수상만을 분취하였다. 상기 수상에 1.1M의 NaCl를 함유하는 TE 용액 80㎕와 에탄올 1.7mL를 가해 -80℃에서 30분간 방치한 후, 원심분리(15000rpm·20분간·4℃)에 의해 DNA 단편의 침전을 회수하였다. 상기 DNA 단편을 공기 건조 후, 최종적으로 10㎕의 TE에 용해시켰다.

<969> [실시예 83] 로도코커스 로도크로우스 J-1주 유래의 니트릴히드라타제 유전자를 발현시키기 위한 플라스미드 벡터의 조제

<970> 500mL의 배플 부착형 삼각 플라스크에 하기 조성의 40㎍/㎖의 황산제이철·칠수화물 및 10㎍/㎖의 염화코발트·육수화물을 함유하는 LB 액체 배지를 100mL 조제하여, 121℃·20분간 오토클레이브에 의해 멸균하였다.

<971> 배지 조성;

<972> 효모 추출물: 5.0g/L, 폴리펩톤: 10.0g/L, NaCl: 5.0g/L, 염화코발트·육수화물: 10.0mg/L, 황산제이철·칠수화물: 40.0mg/L, pH 7.5

<973> 상기 배지에 최종 농도가 100㎍/㎖가 되도록 암피실린을 첨가한 후, 특허 문헌 3 기재의 MT10822(FERMkbp-5785)를 1백금이 접종하여, 37℃·130rpm으로 16시간 배양하였다. 원심분리(15000G × 15분간)에 의해 균체만을 배양액에서 분리하고, 이어서, 50mL의 생리 식염수에 상기 균체를 재현탁한 후에, 한번 더 원심분리를 행하여 습균체를 얻었다. 상기 습균체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 pPT-DB1(도 1)의 플라스미드를 조제하여, RNaseA를 30㎍ 가해 37℃에서 1시간 보온한 후, 페놀 추출/클로로포름 추출 및 에탄올 침전에 의해 DNA를 정제하여, 최종적으로 1.0㎍/㎕가 되도록 TE 용액에 용해시켰다.

<974> 정제한 플라스미드 1㎍을 제한효소 EcoRI 및 Eco47III에 의해 절단한 후, 아가로스 겔 전기영동(시그마사 제조, 타입 VII 저융점 아가로스 사용; 아가로스 농도 0.8중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 약 3.3kbp

와 약 1.3kbp의 DNA의 존재를 확인할 수 있었다. 아가로스 겔로부터 약 3.3kbp의 DNA 단편만을 잘라내어, 이 아가로스편(약 0.1g)을 미세하게 분쇄하여 1mL의 TE 용액에 현탁한 후, 55℃에서 1시간 보온하여 아가로스를 완전하게 융해시켰다. 이 융해액에 대해서 페놀/클로로포름 추출과 에탄올 침전을 행하였다. 우선, TE(1mM의 EDTA·2Na를 함유하는 10mM의 트리스염산 수용액; pH8.0)로 포화시킨 페놀액 1mL를 가해 서서히 교반하였다. 원심분리(3000rpm·10분간)에 의해 수상과 유기상을 분리하여, 수상만을 분취하였다. 이 조작을 3회 반복한 후, 얻어진 수상에 상기 TE 포화 페놀액 0.4mL와 클로로포름 0.4mL를 가해 다시 서서히 교반한 후, 원심분리(3000rpm·10분간)에 의해 수상과 유기상을 한번 더 분리하여, 수상만을 재분취하였다. 상기 수상에 클로로포름 0.8mL를 가해 다시 서서히 교반한 후, 원심분리(3000rpm·10분간)에 의해 수상과 유기상을 한번 더 분리하여, 수상만을 분취하였다. 상기 수상에 1.1M의 NaCl를 함유하는 TE 용액 80㎕와 에탄올 1.7mL를 가해 -80℃에서 30분간 방치한 후, 원심분리(15000rpm·20분간·4℃)에 의해 DNA 단편의 침전을 회수하였다. 상기 DNA 단편을 공기 건조 후, 최종적으로 10㎕의 TE에 용해시켰다.

<975> [실시예 84] 로도코커스 로도크로우스 J-1주 유래의 니트릴히드라타제를 활성 발현시키기 위한 형질전환체의 구축

<976> 실시예 82에서 조제한 EcoRI 및 ScaI에 의해 절단된 약 1.3kbp의 DNA 단편과 실시예 83에서 조제한 EcoRI 및 Eco47III에 의해 절단된 약 3.3kbp의 DNA 단편을 혼합하여, DNA 연결 반응에 제공하였다. 반응 산물에 의해 대장균 HB101의 캄피턴트 세포(토요 방적사 제조)를 형질전환하여, 형질전환체 No. 200을 얻었다.

<977> 500mL의 배플 부착형 삼각 플라스크에 40㎍/㎖의 황산제이철·칠수화물 및 10㎍/㎖의 염화코발트·육수화물을 함유하는 100mL의 LB 액체 배지를 조제하여, 121℃·20분간 오토클레이브에 의해 멸균하였다. 상기 배지에 최종 농도가 100㎍/㎖가 되도록 암피실린을 첨가한 후, 형질전환체 No. 200을 1백금이 접종하여, 37℃·130rpm으로 약 20시간 배양하였다. 이 배양 종료액으로부터 원심분리(5000G × 15분간)에 의해 상기 형질전환체를 분리하였다. 이어서, 분리한 상기 형질전환체를 50mL의 생리 식염수에 재현탁한 후에, 한번 더 원심분리(5000G × 15분간)에 의해 상기 형질전환체를 분리하였다.

<978> 분리한 상기 형질전환체 0.1g을 20mL의 50mM 인산칼륨 수용액(pH7.0)에 현탁시켜, 이것에 0.5mL의 아크릴로니트릴 또는 메타크릴로니트릴을 첨가하여 30℃에서 서서히 교반하면서 1시간 반응시켰다. 반응 종료후, HPLC를 이용하여 반응 종료액의 분석을 행한 결과, 상기 액 중에는 첨가한 니트릴 화합물(아크릴로니트릴 또는 메타크릴로니트릴)에 상당하는 몰량의 아미드 화합물(아크릴아미드 또는 메타크릴아미드)만이 존재하고, 니트릴 화합물(아크릴로니트릴 또는 메타크릴로니트릴) 및 대응하는 유기산(아크릴산 또는 메타크릴산)의 존재는 확인되지 않았다. 즉, 전화율 및 선택률은 100%였다.

<979> 또한, 분리한 상기 형질전환체로부터 알칼리 SDS 추출법에 의해 플라스미드를 조제하여, RNaseA를 30㎍ 가해 37℃에서 1시간 보온한 후, 페놀 추출/클로로포름 추출 및 에탄올 침전에 의해 상기 DNA를 정제하여, 최종적으로 1.0㎍/㎕가 되도록 TE 용액에 용해시켰다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 상기 플라스미드는 그 서열 중에 서열목록의 서열번호 103 기재의 니트릴히드라타제 활성화 단백질을 코딩하는 ORF와 서열목록의 서열번호 104 기재의 로도코커스 로도크로우스 J-1주 유래의 니트릴히드라타제를 코딩하는 ORF를 포함하고 있는 것이 확인되었다. 상기 플라스미드를 pJ1H-DB1(도 2)으로 명명하였다.

<980> [실시예 85] 개변 전의 니트릴히드라타제로부터의 변이 도입 표적의 추출(1)

<981> 개변 방법의 대상으로서, 로도코커스 로도크로우스 J-1주 유래의 니트릴히드라타제를 예로서 사용하였다. 청구항 56 내지 62에 기재된 변이 도입의 표적이 되는 아미노산 잔기를 특정하는 방법을 예로서 사용하여, 표적의 추출을 행하였다. 청구항 56, 57 기재의 특정 방법에 있어서의 아미노산 서열의 얼라인먼트에는 히타치 소프트사 제조의 DNASIS를 사용하였다. 청구항 58 내지 62 기재의 특정 방법에 있어서의 아미노산 서열의 얼라인먼트에 의거하는 입체 구조의 모델링에는 악셀리스사 제조의 모델러 내지 호몰로지를 사용하였다.

<982> 그 결과, 어느 쪽의 방법을 이용한 경우도, 추출된 아미노산 잔기 중에, 상기 니트릴히드라타제를 구성하는 2종의 폴리펩티드의 하나인 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 48번째의 Trp가 포함되어 있었다. 그래서, 변이 도입 표적으로서 로도코커스 로도크로우스 J-1주 유래의 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 48번째의 Trp를 예로서 사용하는 것으로 하였다.

<983> [실시예 86] 개변 전의 니트릴히드라타제로부터의 변이 도입 표적의 추출(2)

<984> 개변 방법의 대상으로서, 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제를 예로서 사용하였다. 청

구항 56 내지 62에 기재된 변이 도입의 표적이 되는 아미노산 잔기를 특정하는 방법을 예로서 사용하여, 표적의 추출을 행하였다. 청구항 56, 57 기재의 특정 방법에 있어서의 아미노산 서열의 얼라인먼트에는 히타치 소프트사 제조의 DNASIS를 사용하였다. 청구항 58 내지 62 기재의 특정 방법에 있어서의 아미노산 서열의 얼라인먼트에 의거하는 입체 구조의 모델링에는 악셀리스사 제조의 모델러 내지 호몰로지를 사용하였다.

<985> 그 결과, 기질이 효소 외부로부터 활성 중심으로 향할 때에나 생성물이 활성 중심으로부터 효소 외부로 향할 때에 통과하는 공동(空洞)을 형성하는 영역에 존재하는 아미노산 잔기로서 추출된 아미노산 잔기 중, 상기 니트릴히드라타제를 구성하는 2종의 폴리펩티드의 하나인 α-서브유닛의 아미노산 서열 중의 36번째의 Thr, 48번째의 Asn를, 또 하나의 폴리펩티드인 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 32번째의 Val, 33번째의 Ala, 37번째의 Phe, 40번째의 Thr, 41번째의 Phe, 46번째의 Met, 48번째의 Leu, 51번째의 Phe, 61번째의 Ala, 72번째의 Trp, 112번째의 Lys, 118번째의 Phe, 127번째의 Leu를, 각각 변이 도입 표적의 대표예로서 사용하는 것으로 하였다.

<986> [실시예 87] 개변 전의 니트릴히드라타제로부터의 변이 도입 표적의 추출(3)

<987> 개변 방법의 대상으로서, 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제를 예로서 사용하였다. 청구항 56 내지 62에 기재된 변이 도입의 표적이 되는 아미노산 잔기를 특정하는 방법을 예로서 사용하여, 표적의 추출을 행하였다. 청구항 56, 57 기재의 특정 방법에 있어서의 아미노산 서열의 얼라인먼트에는 히타치 소프트사 제조의 DNASIS를 사용하였다. 청구항 58 내지 62 기재의 특정 방법에 있어서의 아미노산 서열의 얼라인먼트에 의거하는 입체 구조의 모델링에는 악셀리스사 제조의 모델러 내지 호몰로지를 사용하였다.

<988> 그 결과, 2량체 형성에 관여하는 α-서브유닛과 β-서브유닛 사이의 회합 계면이나 2량체끼리의 회합에 관여하는 계면을 형성하는 영역에 존재하는 아미노산 잔기로서 추출된 아미노산 잔기 중, 상기 니트릴히드라타제를 구성하는 2종의 폴리펩티드의 하나인 α-서브유닛의 아미노산 서열 중의 36번째의 Thr, 148번째의 Gly, 188번째의 Thr, 204번째의 Val를, 또 하나의 폴리펩티드인 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 10번째의 Thr, 32번째의 Val, 33번째의 Ala, 112번째의 Lys, 118번째의 Phe, 127번째의 Leu, 146번째의 Arg, 150번째의 Ala, 160번째의 Arg, 168번째의 Thr, 171번째의 Lys, 176번째의 Tyr, 186번째의 Leu, 217번째의 Asp, 218번째의 Cys를, 각각 변이 도입 표적의 대표예로서 사용하는 것으로 하였다.

<989> [실시예 88] 개변 효소 획득을 목적으로 한 변이 도입(1)

<990> 니트릴히드라타제를 구성하는 폴리펩티드의 아미노산 서열에 변이를 도입하기 위해, 타카라 주조사 제조의 「LA PCR in vitro mutagenesis Kit」를 이용한 부위 특이적인 변이 도입을 행하였다. 이후, 「LA PCR in vitro mutagenesis Kit」를 단순히 키트라고 칭한다. 이하의 실시예에서는 기본적으로 키트의 원리 및 조작 방법에 따랐다.

<991> 실시예 84에서 구축한 로도코커스 로도크로우스 J-1주 유래의 니트릴히드라타제를 코딩하는 ORF를 함유하는 플라스미드: pJ1H-DB1에, 실시예 85에서 추출한 변이 도입 표적인 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 48번째의 Trp를 다른 아미노산으로 변환하기 위한 변이 도입을 행하였다.

<992> 10ng의 pJ1H-DB1을 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 1은, 서열목록의 서열번호 110 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호 107에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초・어닐링(55℃) 30초・신장반응(72℃) 2분간의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 2는, MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호 108에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호 109에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 1과 동일한 조작에 의해 행하였다.

<993> PCR 반응 1 및 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 어느 쪽도 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 마이크로콘100(타카라 주조사 제조)를 이용하여 각각의 PCR 반응 종료액으로부터 과잉의 프라이머 및 dNTP를 제거한 후, TE를 가해 각각 50㎕의 용액을 조제하였다. 이 TE 용액을 각 0.5㎕씩 함유하는 전체량 47.5㎕의 어닐링 용액(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)을 조제하여, 열변성 처리(98℃)를 10분간 행한 후, 37℃까지 60분간 걸쳐 일정한 속도로 냉각을 행하고, 이어서 37℃에서 15분간 유지함으로써 어닐링 처리를 행하였다.

<994> 어닐링 처리액에 TaKaRa LA Taq를 0.5㎕ 가해 72℃에서 3분간 가열 처리를 행하여, 헤테로 2본쇄를 완성시켰다. 이것에 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호 107에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호 109에 서열을 기재)를 각각 50pmol 가해 전체량을 50㎕로 한 후, 열변성(98℃) 15초・어닐링(55℃) 30초・신장반응

(72℃) 2분간의 조건을 25 사이클 반복하는 것에 의한 PCR 반응 3을 행하였다.

<995> PCR 반응 3의 반응 종료액 5㎕를 이용한 아가로스 겔 전기영동(시그마사 제조, 타입 VII 저융점 아가로스 사용; 아가로스 농도 0.8중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 약 1.9kbp의 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이어서, 아가로스 겔로부터 약 1.9kbp의 DNA 단편만을 잘라내어, 이 아가로스편(약 0.1g)을 미세하게 분쇄하여 1mL의 TE 용액에 현탁한 후, 55℃에서 1시간 보온하여 아가로스를 완전하게 융해시켰다. 이 융해액에 대해서 페놀/클로로포름 추출과 에탄올 침전을 행하여 상기 DNA 단편을 정제하여, 최종적으로 10㎕의 TE에 용해시켰다.

<996> 정제한 약 1.9kbp의 증폭 DNA 단편을 제한효소 EcoRI 및 HindIII에 의해 절단한 후, 이 제한효소 처리액에 대해서 페놀/클로로포름 추출과 에탄올 침전을 행하여 상기 DNA 단편을 정제하여, 최종적으로 10㎕의 TE에 용해시켰다. 마찬가지로, EcoRI 및 HindIII에 의해 pJ1H-DB1을 절단하여, 아가로스 겔 전기영동(시그마사 제조, 타입 VII 저융점 아가로스 사용; 아가로스 농도 0.7%)을 행하여, 아가로스 겔로부터 약 2.7kbp의 DNA 단편만을 잘라내었다. 잘라낸 아가로스편(약 0.1g)을 미세하게 분쇄하여 1mL의 TE 용액에 현탁한 후, 55℃에서 1시간 보온하여 아가로스를 완전하게 융해시켰다. 이 융해액에 대해서 페놀/클로로포름 추출과 에탄올 침전을 행하여 상기 DNA 단편을 정제하여, 최종적으로 10㎕의 TE에 용해시켰다.

<997> 이와 같이 하여 얻어진 약 1.9kbp와 약 2.7kbp의 DNA 단편을 DNA 연결 반응에 제공한 후, 대장균 HB101의 컴피턴트 세포(토요 방적사 제조)를 형질전환하여, 다수의 형질전환체를 얻었다. 상기 형질전환체로부터 각각 플라스미드를 조제하여, RNaseA를 30㎍ 가해 37℃에서 1시간 보온한 후, 페놀 추출/클로로포름 추출 및 에탄올 침전에 의해 상기 DNA를 정제하여, 최종적으로 1.0㎍/㎕가 되도록 TE 용액에 용해시켰다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 염기 서열을 결정하였다.

<998> 그 결과, 얻어진 형질전환체가 갖는 플라스미드는, pJ1H-DB1과 비교하여, 로도코커스 로도크로우스 J-1주 유래의 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 48번째의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열이 Trp 이외의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열로 변화한 것임이 판명되었다.

<999> 하기 표 121에, 얻어진 형질전환체의 번호와 변이 개소·아미노산 서열의 변화·염기 서열의 변화와의 대응을 나타낸다.

표 121

<1000>

번호	변이 개소	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		변이 도입 전	변이 도입 후	변이 도입 전	변이 도입 후
No. 201	β-48번째	Trp	Tyr	tgg	tat
No. 202	β-48번째	Trp	Val	tgg	gtg
No. 203	β-48번째	Trp	Ala	tgg	gcg
No. 204	β-48번째	Trp	Gly	tgg	ggg

<1001> [실시예 89] 개변 효소 획득을 목적으로 한 변이 도입(2)

<1002> 실시예 83에서 MT10822로부터 조제한 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제를 코딩하는 ORF를 함유하는 플라스미드: pPT-DB1에, 실시예 86 또는 87에서 추출한 변이 도입 표적인 α-서브유닛의 아미노산 서열 중의 36번째의 Thr를 다른 아미노산으로 변환하기 위한 변이 도입을 행하였다.

<1003> 10ng의 pPT-DB1을 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 1은, 서열목록의 서열번호 111 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호 107에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초·어닐링(55℃) 30초·신장반응(72℃) 2분간의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 2는, MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호 108에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호 109에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 1과 동일한 조작에 의해 행하였다.

<1004> PCR 반응 1 및 2의 반응 종료액 각 5㎕를 사용한 아가로스 겔 전기영동(아가로스 농도 1.0중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 어느 쪽도 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 마이크로콘100(타카라 주조사 제조)를 이용하여 각각의 PCR 반응 종료액으로부터 과잉의 프라이머 및 dNTP를 제거한 후, TE를 가해 각각 50㎕의 용액을 조제하였다. 이 TE 용액을 각 0.5㎕씩 함유하는 전체량 47.5㎕의 어닐링 용액(조성은 키트에 기재된

조건에 따름)을 조제하여, 열변성 처리(98℃)를 10분간 행한 후, 37℃까지 60분간 걸쳐 일정한 속도로 냉각을 행하고, 이어서 37℃에서 15분간 유지함으로써 어닐링 처리를 행하였다.

<1005> 어닐링 처리액에 TaKaRa LA Taq를 0.5㎕ 가해 72℃에서 3분간 가열 처리를 행하여, 헤테로 2본쇄를 완성시켰다. 이것에 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호 107에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호 109에 서열을 기재)를 각각 50pmol 가해 전체량을 50㎕로 한 후, 열변성(98℃) 15초·어닐링(55℃) 30초·신장반응(72℃) 2분간의 조건을 25 사이클 반복하는 것에 의한 PCR 반응 3을 행하였다.

<1006> PCR 반응 3의 반응 종료액 5㎕를 이용한 아가로스 겔 전기영동(시그마사 제조, 타입 VII 저융점 아가로스 사용; 아가로스 농도 0.8중량%)에 의해 DNA 증폭 산물의 분석을 행한 바, 약 1.9kbp의 증폭 DNA 산물의 존재를 확인할 수 있었다. 이어서, 아가로스 겔로부터 약 1.9kbp의 DNA 단편만을 잘라내어, 이 아가로스편(약 0.1g)을 미세하게 분쇄하여 1mL의 TE 용액에 현탁한 후, 55℃에서 1시간 보온하여 아가로스를 완전하게 융해시켰다. 이 융해액에 대해서 페놀/클로로포름 추출과 에탄올 침전을 행하여 상기 DNA 단편을 정제하여, 최종적으로 10㎕의 TE에 용해시켰다.

<1007> 정제한 약 1.9kbp의 증폭 DNA 단편을 제한효소 EcoRI 및 HindIII에 의해 절단한 후, 이 제한효소 처리액에 대해서 페놀/클로로포름 추출과 에탄올 침전을 행하여 상기 DNA 단편을 정제하여, 최종적으로 10㎕의 TE에 용해시켰다. 마찬가지로, EcoRI 및 HindIII에 의해 pPT-DB1을 절단하여, 아가로스 겔 전기영동(시그마사 제조, 타입 VII 저융점 아가로스 사용; 아가로스 농도 0.7%)을 행하여, 아가로스 겔로부터 약 2.7kbp의 DNA 단편만을 잘라내었다. 잘라낸 아가로스편(약 0.1g)을 미세하게 분쇄하여 1mL의 TE 용액에 현탁한 후, 55℃에서 1시간 보온하여 아가로스를 완전하게 융해시켰다. 이 융해액에 대해서 페놀/클로로포름 추출과 에탄올 침전을 행하여 상기 DNA 단편을 정제하여, 최종적으로 10㎕의 TE에 용해시켰다.

<1008> 이와 같이 하여 얻어진 약 1.9kbp와 약 2.7kbp의 DNA 단편을 DNA 연결 반응에 제공한 후, 대장균 HB101의 컴피턴트 세포(토요 방적사 제조)를 형질전환하여, 다수의 형질전환체를 얻었다. 상기 형질전환체로부터 각각 플라스미드를 조제하여, RNaseA를 30㎍ 가해 37℃에서 1시간 보온한 후, 페놀 추출/클로로포름 추출 및 에탄올 침전에 의해 상기 DNA를 정제하여, 최종적으로 1.0㎍/㎕가 되도록 TE 용액에 용해시켰다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 염기 서열을 결정하였다.

<1009> 그 결과, 얻어진 형질전환체가 갖는 플라스미드는, pPT-DB1과 비교하여, 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 아미노산 서열 중의 36번째의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열이 Thr 이외의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열로 변화한 것임이 판명되었다.

<1010> 하기 표 122에, 얻어진 형질전환체의 번호와 변이 개소·아미노산 서열의 변화·염기 서열의 변화와의 대응을 나타낸다.

표 122

<1011>

번호	변이 개소	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		변이 도입 전	변이 도입 후	변이 도입 전	변이 도입 후
No. 40	α-36번째	Thr	Met	acg	atg
No. 40a	α-36번째	Thr	Ser	acg	tcg
No. 40b	α-36번째	Thr	Ala	acg	gcg
No. 40c	α-36번째	Thr	Gly	acg	ggg
No. 40d	α-36번째	Thr	Trp	acg	tgg

<1012> [실시예 90] 개변 효소 획득을 목적으로 한 변이 도입(3)

<1013> 실시예 83에서 MT10822로부터 조제한 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제를 코딩하는 ORF를 함유하는 플라스미드: pPT-DB1에, 실시예 86 또는 87에서 추출한 변이 도입 표적인 α-서브유닛의 아미노산 서열 중의 48번째의 Asn를 다른 아미노산으로 변환하기 위한 변이 도입을 행하였다.

<1014> 10ng의 pPT-DB1을 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 1은, 서열목록의 서열번호 112 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호 107에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초·어닐링(55℃) 30초·신장반응(72℃) 2분간의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 2는, MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호 108에 서열을

기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호 109에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 1과 동일한 조작에 의해 행하였다.

<1015> 이후, 실시예 89와 동일한 조작을 행하여 다수의 형질전환체를 얻었다. 상기 형질전환체로부터 각각 플라스미드를 조제하여, RNaseA를 30㎍ 가해 37℃에서 1시간 보온한 후, 페놀 추출/클로로포름 추출 및 에탄올 침전에 의해 DNA를 정제하여, 최종적으로 1.0㎍/㎕가 되도록 TE 용액에 용해시켰다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 염기 서열을 결정하였다.

<1016> 그 결과, 얻어진 형질전환체가 갖는 플라스미드는, pPT-DB1과 비교하여, 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 아미노산 서열 중의 48번째의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열이 Asn 이외의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열로 변화한 것임이 판명되었다.

<1017> 하기 표 123에, 얻어진 형질전환체의 번호와 변이 개소·아미노산 서열의 변화·염기 서열의 변화와의 대응을 나타낸다.

표 123

<1018>

번호	변이 개소	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		변이 도입 전	변이 도입 후	변이 도입 전	변이 도입 후
No. 40e	α-48번째	Asn	Gln	aac	caa
No. 40f	α-48번째	Asn	Glu	aac	gaa

<1019> [실시예 91] 개변 효소 획득을 목적으로 한 변이 도입(4)

<1020> 실시예 83에서 MT10822로부터 조제한 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제를 코딩하는 ORF를 함유하는 플라스미드: pPT-DB1에, 실시예 86 또는 87에서 추출한 변이 도입 표적인 α-서브유닛의 아미노산 서열 중의 71번째의 Arg을 다른 아미노산으로 변환하기 위한 변이 도입을 행하였다.

<1021> 10ng의 pPT-DB1을 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 1은, 서열목록의 서열번호 113 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호 107에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초·어닐링(55℃) 30초·신장반응(72℃) 2분간의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 2는, MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호 108에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호 109에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 1과 동일한 조작에 의해 행하였다.

<1022> 이후, 실시예 89와 동일한 조작을 행하여 다수의 형질전환체를 얻었다. 상기 형질전환체로부터 각각 플라스미드를 조제하여, RNaseA를 30㎍ 가해 37℃에서 1시간 보온한 후, 페놀 추출/클로로포름 추출 및 에탄올 침전에 의해 DNA를 정제하여, 최종적으로 1.0㎍/㎕가 되도록 TE 용액에 용해시켰다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 염기 서열을 결정하였다.

<1023> 그 결과, 얻어진 형질전환체가 갖는 플라스미드는, pPT-DB1과 비교하여, 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 아미노산 서열 중의 71번째의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열이 Arg 이외의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열로 변화한 것임이 판명되었다.

<1024> 하기 표 124에, 얻어진 형질전환체의 번호와 변이 개소·아미노산 서열의 변화·염기 서열의 변화와의 대응을 나타낸다.

표 124

<1025>

번호	변이 개소	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		변이 도입 전	변이 도입 후	변이 도입 전	변이 도입 후
No. 41	α-71번째	Arg	His	cgt	cat

<1026> [실시예 92] 개변 효소 획득을 목적으로 한 변이 도입(5)

<1027> 실시예 83에서 MT10822로부터 조제한 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제를 코딩하는 ORF를 함유하는 플라스미드: pPT-DB1에, 실시예 86 또는 87에서 추출한 변이 도입 표적인 α-서브유닛의 아미노

산 서열 중의 148번째의 Gly를 다른 아미노산으로 변환하기 위한 변이 도입을 행하였다.

<1028> 10ng의 pPT-DB1을 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 1은, 서열목록의 서열번호 114 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호 107에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초·어닐링(55℃) 30초·신장반응(72℃) 2분간의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 2는, MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호 108에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호 109에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 1과 동일한 조작에 의해 행하였다.

<1029> 이후, 실시예 89와 동일한 조작을 행하여 다수의 형질전환체를 얻었다. 상기 형질전환체로부터 각각 플라스미드를 조제하여, RNaseA를 30㎍ 가해 37℃에서 1시간 보온한 후, 페놀 추출/클로로포름 추출 및 에탄올 침전에 의해 DNA를 정제하여, 최종적으로 1.0㎍/㎕가 되도록 TE 용액에 용해시켰다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 염기 서열을 결정하였다.

<1030> 그 결과, 얻어진 형질전환체가 갖는 플라스미드는, pPT-DB1과 비교하여, 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 아미노산 서열 중의 148번째의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열이 Gly 이외의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열로 변화한 것임이 판명되었다.

<1031> 하기 표 125에, 얻어진 형질전환체의 번호와 변이 개소·아미노산 서열의 변화·염기 서열의 변화와의 대응을 나타낸다.

표 125

<1032>

번호	변이 개소	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		변이 도입 전	변이 도입 후	변이 도입 전	변이 도입 후
No. 42	α-148번째	Gly	Asp	ggc	gac

<1033> [실시예 93] 개변 효소 획득을 목적으로 한 변이 도입(6)

<1034> 실시예 83에서 MT10822로부터 조제한 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제를 코딩하는 ORF를 함유하는 플라스미드: pPT-DB1에, 실시예 86 또는 87에서 추출한 변이 도입 표적인 α-서브유닛의 아미노산 서열 중의 188번째의 Thr를 다른 아미노산으로 변환하기 위한 변이 도입을 행하였다.

<1035> 10ng의 pPT-DB1을 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 1은, 서열목록의 서열번호 115 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호 107에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초·어닐링(55℃) 30초·신장반응(72℃) 2분간의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 2는, MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호 108에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호 109에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 1과 동일한 조작에 의해 행하였다.

<1036> 이후, 실시예 89와 동일한 조작을 행하여 다수의 형질전환체를 얻었다. 상기 형질전환체로부터 각각 플라스미드를 조제하여, RNaseA를 30㎍ 가해 37℃에서 1시간 보온한 후, 페놀 추출/클로로포름 추출 및 에탄올 침전에 의해 DNA를 정제하여, 최종적으로 1.0㎍/㎕가 되도록 TE 용액에 용해시켰다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 염기 서열을 결정하였다.

<1037> 그 결과, 얻어진 형질전환체가 갖는 플라스미드는, pPT-DB1과 비교하여, 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 아미노산 서열 중의 188번째의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열이 Thr 이외의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열로 변화한 것임이 판명되었다.

<1038> 하기 표 126에, 얻어진 형질전환체의 번호와 변이 개소·아미노산 서열의 변화·염기 서열의 변화와의 대응을 나타낸다.

표 126

<1039>

번호	변이 개소	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		변이 도입 전	변이 도입 후	변이 도입 전	변이 도입 후
No. 42a	α-188번째	Thr	Gly	acc	ggc

<1040> [실시예 94] 개변 효소 획득을 목적으로 한 변이 도입(7)

<1041> 실시예 83에서 MT10822로부터 조제한 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제를 코딩하는 ORF를 함유하는 플라스미드: pPT-DB1에, 실시예 86 또는 87에서 추출한 변이 도입 표적인 α-서브유닛의 아미노산 서열 중의 204번째의 Val를 다른 아미노산으로 변환하기 위한 변이 도입을 행하였다.

<1042> 10ng의 pPT-DB1을 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 1은, 서열목록의 서열번호 116 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호 107에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초·어닐링(55℃) 30초·신장반응(72℃) 2분간의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 2는, MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호 108에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호 109에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 1과 동일한 조작에 의해 행하였다.

<1043> 이후, 실시예 89와 동일한 조작을 행하여 다수의 형질전환체를 얻었다. 상기 형질전환체로부터 각각 플라스미드를 조제하여, RNaseA를 30㎍ 가해 37℃에서 1시간 보온한 후, 페놀 추출/클로로포름 추출 및 에탄올 침전에 의해 DNA를 정제하여, 최종적으로 1.0㎍/㎕가 되도록 TE 용액에 용해시켰다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 염기 서열을 결정하였다.

<1044> 그 결과, 얻어진 형질전환체가 갖는 플라스미드는, pPT-DB1과 비교하여, 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제의 α-서브유닛의 아미노산 서열 중의 204번째의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열이 Val 이외의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열로 변화한 것임이 판명되었다.

<1045> 하기 표 127에, 얻어진 형질전환체의 번호와 변이 개소·아미노산 서열의 변화·염기 서열의 변화와의 대응을 나타낸다.

표 127

<1046>

번호	변이 개소	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		변이 도입 전	변이 도입 후	변이 도입 전	변이 도입 후
No. 43	α-204번째	Val	Arg	gtc	cgc
No. 44	α-204번째	Val	Lys	gtc	aaa
No. 45	α-204번째	Val	Trp	gtc	tgg
No. 46	α-204번째	Val	Thr	gtc	acc

<1047> [실시예 95] 개변 효소 획득을 목적으로 한 변이 도입(8)

<1048> 실시예 83에서 MT10822로부터 조제한 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제를 코딩하는 ORF를 함유하는 플라스미드: pPT-DB1에, 실시예 86 또는 87에서 추출한 변이 도입 표적인 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 10번째의 Thr를 다른 아미노산으로 변환하기 위한 변이 도입을 행하였다.

<1049> 10ng의 pPT-DB1을 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 1은, 서열목록의 서열번호 117 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호 107에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초·어닐링(55℃) 30초·신장반응(72℃) 2분간의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 2는, MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호 108에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호 109에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 1과 동일한 조작에 의해 행하였다.

<1050> 이후, 실시예 89와 동일한 조작을 행하여 다수의 형질전환체를 얻었다. 상기 형질전환체로부터 각각 플라스미드를 조제하여, RNaseA를 30㎍ 가해 37℃에서 1시간 보온한 후, 페놀 추출/클로로포름 추출 및 에탄올 침전에 의해 DNA를 정제하여, 최종적으로 1.0㎍/㎕가 되도록 TE 용액에 용해시켰다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 염기 서열을 결정하였다.

<1051> 그 결과, 얻어진 형질전환체가 갖는 플라스미드는, pPT-DB1과 비교하여, 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 10번째의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열이 Thr 이외의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열로 변화한 것임이 판명되었다.

<1052> 하기 표 128에, 얻어진 형질전환체의 번호와 변이 개소·아미노산 서열의 변화·염기 서열의 변화와의 대응을 나타낸다.

표 128

<1053>

번호	변이 개소	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		변이 도입 전	변이 도입 후	변이 도입 전	변이 도입 후
No. 47	β-10번째	Thr	Asp	acc	gac
No. 48	β-10번째	Thr	Glu	acc	gaa
No. 49	β-10번째	Thr	Trp	acc	tgg
No. 50	β-10번째	Thr	Gly	acc	ggc
No. 51	β-10번째	Thr	Tyr	acc	tac
No. 52	β-10번째	Thr	Cys	acc	tgc

<1054> [실시예 96] 개변 효소 획득을 목적으로 한 변이 도입(9)

<1055> 실시예 83에서 MT10822로부터 조제한 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제를 코딩하는 ORF를 함유하는 플라스미드: pPT-DB1에, 실시예 86 또는 87에서 추출한 변이 도입 표적인 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 32번째의 Val를 다른 아미노산으로 변환하기 위한 변이 도입을 행하였다.

<1056> 10ng의 pPT-DB1을 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 1은, 서열목록의 서열번호 118 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호 107에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초·어닐링(55℃) 30초·신장반응(72℃) 2분간의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 2는, MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호 108에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호 109에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 1과 동일한 조작에 의해 행하였다.

<1057> 이후, 실시예 89와 동일한 조작을 행하여 다수의 형질전환체를 얻었다. 상기 형질전환체로부터 각각 플라스미드를 조제하여, RNaseA를 30㎍ 가해 37℃에서 1시간 보온한 후, 페놀 추출/클로로포름 추출 및 에탄올 침전에 의해 DNA를 정제하여, 최종적으로 1.0㎍/㎕가 되도록 TE 용액에 용해시켰다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 염기 서열을 결정하였다.

<1058> 그 결과, 얻어진 형질전환체가 갖는 플라스미드는, pPT-DB1과 비교하여, 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 32번째의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열이 Val 이외의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열로 변화한 것임이 판명되었다.

<1059> 하기 표 129에, 얻어진 형질전환체의 번호와 변이 개소·아미노산 서열의 변화·염기 서열의 변화와의 대응을 나타낸다.

표 129

<1060>

번호	변이 개소	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		변이 도입 전	변이 도입 후	변이 도입 전	변이 도입 후
No. 53	β-32번째	Val	Gly	gtc	ggc

<1061> [실시예 97] 개변 효소 획득을 목적으로 한 변이 도입(10)

<1062> 실시예 83에서 MT10822로부터 조제한 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제를 코딩하는 ORF를 함유하는 플라스미드: pPT-DB1에, 실시예 86 또는 87에서 추출한 변이 도입 표적인 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 33번째의 Ala를 다른 아미노산으로 변환하기 위한 변이 도입을 행하였다.

<1063> 10ng의 pPT-DB1을 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 1은, 서열목록의 서열번호 119 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호 107에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초·어닐링(55℃) 30초·신장반응(72℃) 2분간의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 2는, MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호 108에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호 109에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계

(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 1과 동일한 조작에 의해 행하였다.

<1064> 이후, 실시예 89와 동일한 조작을 행하여 다수의 형질전환체를 얻었다. 상기 형질전환체로부터 각각 플라스미드를 조제하여, RNaseA를 30㎍ 가해 37℃에서 1시간 보온한 후, 페놀 추출/클로로포름 추출 및 에탄올 침전에 의해 DNA를 정제하여, 최종적으로 1.0㎍/㎕가 되도록 TE 용액에 용해시켰다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 염기 서열을 결정하였다.

<1065> 그 결과, 얻어진 형질전환체가 갖는 플라스미드는, pPT-DB1과 비교하여, 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 33번째의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열이 Ala 이외의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열로 변화한 것임이 판명되었다.

<1066> 하기 표 130에, 얻어진 형질전환체의 번호와 변이 개소·아미노산 서열의 변화·염기 서열의 변화와의 대응을 나타낸다.

표 130

<1067>

번호	변이 개소	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		변이 도입 전	변이 도입 후	변이 도입 전	변이 도입 후
No. 53a	β-33번째	Ala	Val	gcg	gtg
No. 53b	β-33번째	Ala	Met	gcg	atg

<1068> [실시예 98] 개변 효소 획득을 목적으로 한 변이 도입(11)

<1069> 실시예 83에서 MT10822로부터 조제한 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제를 코딩하는 ORF를 함유하는 플라스미드: pPT-DB1에, 실시예 86 또는 87에서 추출한 변이 도입 표적인 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 37번째의 Phe를 다른 아미노산으로 변환하기 위한 변이 도입을 행하였다.

<1070> 10ng의 pPT-DB1을 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 1은, 서열목록의 서열번호 120 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호 107에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초·어닐링(55℃) 30초·신장반응(72℃) 2분간의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 2는, MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호 108에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호 109에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 1과 동일한 조작에 의해 행하였다.

<1071> 이후, 실시예 89와 동일한 조작을 행하여 다수의 형질전환체를 얻었다. 상기 형질전환체로부터 각각 플라스미드를 조제하여, RNaseA를 30㎍ 가해 37℃에서 1시간 보온한 후, 페놀 추출/클로로포름 추출 및 에탄올 침전에 의해 DNA를 정제하여, 최종적으로 1.0㎍/㎕가 되도록 TE 용액에 용해시켰다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 염기 서열을 결정하였다.

<1072> 그 결과, 얻어진 형질전환체가 갖는 플라스미드는, pPT-DB1과 비교하여, 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 37번째의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열이 Phe 이외의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열로 변화한 것임이 판명되었다.

<1073> 하기 표 131에, 얻어진 형질전환체의 번호와 변이 개소·아미노산 서열의 변화·염기 서열의 변화와의 대응을 나타낸다.

표 131

<1074>

번호	변이 개소	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		변이 도입 전	변이 도입 후	변이 도입 전	변이 도입 후
No. 54	β-37번째	Phe	Thr	ttc	acc
No. 55	β-37번째	Phe	Ala	ttc	gcc
No. 56	β-37번째	Phe	Leu	ttc	ctc
No. 57	β-37번째	Phe	Ile	ttc	atc
No. 58	β-37번째	Phe	Val	ttc	gtc

<1075> [실시예 99] 개변 효소 획득을 목적으로 한 변이 도입(12)

<1076> 실시예 83에서 MT10822로부터 조제한 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제를 코딩하는 ORF를 함유하는 플라스미드: pPT-DB1에, 실시예 86 또는 87에서 추출한 변이 도입 표적인 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 40번째의 Thr를 다른 아미노산으로 변환하기 위한 변이 도입을 행하였다.

<1077> 10ng의 pPT-DB1을 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 1은, 서열목록의 서열번호 121 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호 107에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초·어닐링(55℃) 30초·신장반응(72℃) 2분간의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 2는, MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호 108에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호 109에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 1과 동일한 조작에 의해 행하였다.

<1078> 이후, 실시예 89와 동일한 조작을 행하여 다수의 형질전환체를 얻었다. 상기 형질전환체로부터 각각 플라스미드를 조제하여, RNaseA를 30㎍ 가해 37℃에서 1시간 보온한 후, 페놀 추출/클로로포름 추출 및 에탄올 침전에 의해 DNA를 정제하여, 최종적으로 1.0㎍/㎕가 되도록 TE 용액에 용해시켰다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 염기 서열을 결정하였다.

<1079> 그 결과, 얻어진 형질전환체가 갖는 플라스미드는, pPT-DB1과 비교하여, 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 40번째의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열이 Thr 이외의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열로 변화한 것임이 판명되었다.

<1080> 하기 표 132에, 얻어진 형질전환체의 번호와 변이 개소·아미노산 서열의 변화·염기 서열의 변화와의 대응을 나타낸다.

표 132

<1081>

번호	변이 개소	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		변이 도입 전	변이 도입 후	변이 도입 전	변이 도입 후
No. 58a	β-40번째	Thr	Val	acg	gtg
No. 58b	β-40번째	Thr	Leu	acg	ctg
No. 58c	β-40번째	Thr	Ile	acg	att

<1082> [실시예 100] 개변 효소 획득을 목적으로 한 변이 도입(13)

<1083> 실시예 83에서 MT10822로부터 조제한 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제를 코딩하는 ORF를 함유하는 플라스미드: pPT-DB1에, 실시예 86 또는 87에서 추출한 변이 도입 표적인 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 41번째의 Phe를 다른 아미노산으로 변환하기 위한 변이 도입을 행하였다.

<1084> 10ng의 pPT-DB1을 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 1은, 서열목록의 서열번호 122 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호 107에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초·어닐링(55℃) 30초·신장반응(72℃) 2분간의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 2는, MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호 108에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호 109에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 1과 동일한 조작에 의해 행하였다.

<1085> 이후, 실시예 89와 동일한 조작을 행하여 다수의 형질전환체를 얻었다. 상기 형질전환체로부터 각각 플라스미드를 조제하여, RNaseA를 30㎍ 가해 37℃에서 1시간 보온한 후, 페놀 추출/클로로포름 추출 및 에탄올 침전에 의해 DNA를 정제하여, 최종적으로 1.0㎍/㎕가 되도록 TE 용액에 용해시켰다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 염기 서열을 결정하였다.

<1086> 그 결과, 얻어진 형질전환체가 갖는 플라스미드는, pPT-DB1과 비교하여, 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 41번째의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열이 Phe 이외의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열로 변화한 것임이 판명되었다.

<1087> 하기 표 133에, 얻어진 형질전환체의 번호와 변이 개소·아미노산 서열의 변화·염기 서열의 변화와의 대응을 나타낸다.

표 133

<1088>

번호	변이 개소	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		변이 도입 전	변이 도입 후	변이 도입 전	변이 도입 후
No. 59	β-41번째	Phe	Glu	ttc	gaa
No. 60	β-41번째	Phe	Thr	ttc	acc
No. 61	β-41번째	Phe	Ala	ttc	gcc
No. 62	β-41번째	Phe	Leu	ttc	ctc
No. 63	β-41번째	phe	Ile	ttc	atc
No. 64	β-41번째	Phe	Val	ttc	gtc

<1089> [실시예 101] 개변 효소 획득을 목적으로 한 변이 도입(14)

<1090> 실시예 83에서 MT10822로부터 조제한 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제를 코딩하는 ORF를 함유하는 플라스미드: pPT-DB1에, 실시예 86 또는 87에서 추출한 변이 도입 표적인 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 46번째의 Met를 다른 아미노산으로 변환하기 위한 변이 도입을 행하였다.

<1091> 10ng의 pPT-DB1을 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 1은, 서열목록의 서열번호 123 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호 107에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초·어닐링(55℃) 30초·신장반응(72℃) 2분간의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 2는, MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호 108에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호 109에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 1과 동일한 조작에 의해 행하였다.

<1092> 이후, 실시예 89와 동일한 조작을 행하여 다수의 형질전환체를 얻었다. 상기 형질전환체로부터 각각 플라스미드를 조제하여, RNaseA를 30㎍ 가해 37℃에서 1시간 보온한 후, 페놀 추출/클로로포름 추출 및 에탄올 침전에 의해 DNA를 정제하여, 최종적으로 1.0㎍/㎕가 되도록 TE 용액에 용해시켰다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 염기 서열을 결정하였다.

<1093> 그 결과, 얻어진 형질전환체가 갖는 플라스미드는, pPT-DB1과 비교하여, 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 46번째의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열이 Met 이외의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열로 변화한 것임이 판명되었다.

<1094> 하기 표 134에, 얻어진 형질전환체의 번호와 변이 개소·아미노산 서열의 변화·염기 서열의 변화와의 대응을 나타낸다.

표 134

<1095>

번호	변이 개소	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		변이 도입 전	변이 도입 후	변이 도입 전	변이 도입 후
No. 65	β-46번째	Met	Gly	atg	ggg
No. 66	β-46번째	Met	Tyr	atg	tat
No. 67	β-46번째	Met	Leu	atg	ctg
No. 68	β-46번째	Met	Lys	atg	aag
No. 69	β-46번째	Met	Asp	atg	gat

<1096> [실시예 102] 개변 효소 획득을 목적으로 한 변이 도입(15)

<1097> 실시예 83에서 MT10822로부터 조제한 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제를 코딩하는 ORF를 함유하는 플라스미드: pPT-DB1에, 실시예 86 또는 87에서 추출한 변이 도입 표적인 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 48번째의 Leu를 다른 아미노산으로 변환하기 위한 변이 도입을 행하였다.

<1098> 10ng의 pPT-DB1을 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 1은, 서열목록의 서열번호 124 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호 107에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초·어닐링(55℃) 30초·신장반응(72℃) 2분간

의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 2는, MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호 108에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호 109에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 1과 동일한 조작에 의해 행하였다.

<1099> 이후, 실시예 89와 동일한 조작을 행하여 다수의 형질전환체를 얻었다. 상기 형질전환체로부터 각각 플라스미드를 조제하여, RNaseA를 30㎍ 가해 37℃에서 1시간 보온한 후, 페놀 추출/클로로포름 추출 및 에탄올 침전에 의해 DNA를 정제하여, 최종적으로 1.0㎍/㎕가 되도록 TE 용액에 용해시켰다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 염기 서열을 결정하였다.

<1100> 그 결과, 얻어진 형질전환체가 갖는 플라스미드는, pPT-DB1과 비교하여, 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 48번째의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열이 Leu 이외의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열로 변화한 것임이 판명되었다.

<1101> 하기 표 135에, 얻어진 형질전환체의 번호와 변이 개소·아미노산 서열의 변화·염기 서열의 변화와의 대응을 나타낸다.

표 135

<1102>

번호	변이 개소	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		변이 도입 전	변이 도입 후	변이 도입 전	변이 도입 후
No. 70	β-48번째	Leu	Gly	ctg	ggg
No. 71	β-48번째	Leu	Ala	ctg	gcg
No. 72	β-48번째	Leu	Val	ctg	gtg
No. 73	β-48번째	Leu	Ser	ctg	tcg
No. 74	β-48번째	Leu	Thr	ctg	acg
No. 75	β-48번째	Leu	Arg	ctg	cgg

<1103> [실시예 103] 개변 효소 획득을 목적으로 한 변이 도입(16)

<1104> 실시예 83에서 MT10822로부터 조제한 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제를 코딩하는 ORF를 함유하는 플라스미드: pPT-DB1에, 실시예 86 또는 87에서 추출한 변이 도입 표적인 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 51번째의 Phe를 다른 아미노산으로 변환하기 위한 변이 도입을 행하였다.

<1105> 10ng의 pPT-DB1을 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 1은, 서열목록의 서열번호 125 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호 107에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초·어닐링(55℃) 30초·신장반응(72℃) 2분간의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 2는, MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호 108에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호 109에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 1과 동일한 조작에 의해 행하였다.

<1106> 이후, 실시예 89와 동일한 조작을 행하여 다수의 형질전환체를 얻었다. 상기 형질전환체로부터 각각 플라스미드를 조제하여, RNaseA를 30㎍ 가해 37℃에서 1시간 보온한 후, 페놀 추출/클로로포름 추출 및 에탄올 침전에 의해 DNA를 정제하여, 최종적으로 1.0㎍/㎕가 되도록 TE 용액에 용해시켰다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 염기 서열을 결정하였다.

<1107> 그 결과, 얻어진 형질전환체가 갖는 플라스미드는, pPT-DB1과 비교하여, 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 51번째의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열이 Phe 이외의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열로 변화한 것임이 판명되었다.

<1108> 하기 표 136에, 얻어진 형질전환체의 번호와 변이 개소·아미노산 서열의 변화·염기 서열의 변화와의 대응을 나타낸다.

표 136

<1109>

번호	변이 개소	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		변이 도입 전	변이 도입 후	변이 도입 전	변이 도입 후

No. 76	β-51번째	Phe	Ala	ttc	gcc
No. 77	β-51번째	Phe	Val	ttc	gtc

<1110> [실시예 104] 개변 효소 획득을 목적으로 한 변이 도입(17)

<1111> 실시예 83에서 MT10822로부터 조제한 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제를 코딩하는 ORF를 함유하는 플라스미드: pPT-DB1에, 실시예 86 또는 87에서 추출한 변이 도입 표적인 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 61번째의 Ala를 다른 아미노산으로 변환하기 위한 변이 도입을 행하였다.

<1112> 10ng의 pPT-DB1을 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 1은, 서열목록의 서열번호 126 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호 107에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초·어닐링(55℃) 30초·신장반응(72℃) 2분간의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 2는, MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호 108에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호 109에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 1과 동일한 조작에 의해 행하였다.

<1113> 이후, 실시예 89와 동일한 조작을 행하여 다수의 형질전환체를 얻었다. 상기 형질전환체로부터 각각 플라스미드를 조제하여, RNaseA를 30㎍ 가해 37℃에서 1시간 보온한 후, 페놀 추출/클로로포름 추출 및 에탄올 침전에 의해 DNA를 정제하여, 최종적으로 1.0㎍/㎕가 되도록 TE 용액에 용해시켰다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 염기 서열을 결정하였다.

<1114> 그 결과, 얻어진 형질전환체가 갖는 플라스미드는, pPT-DB1과 비교하여, 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 61번째의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열이 Ala 이외의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열로 변화한 것임이 판명되었다.

<1115> 하기 표 137에, 얻어진 형질전환체의 번호와 변이 개소·아미노산 서열의 변화·염기 서열의 변화와의 대응을 나타낸다.

표 137

<1116>

번호	변이 개소	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		변이 도입 전	변이 도입 후	변이 도입 전	변이 도입 후
No. 77a	β-61번째	Ala	Val	gcc	gtc
No. 77b	β-61번째	Ala	Leu	gcc	ctc
No. 77c	β-61번째	Ala	Gly	gcc	ggc
No. 77d	β-61번째	Ala	Ser	gcc	tcg
No. 77e	β-61번째	Ala	Thr	gcc	acg
No. 77f	β-61번째	Ala	Trp	gcc	tgg

<1117> [실시예 105] 개변 효소 획득을 목적으로 한 변이 도입(18)

<1118> 실시예 83에서 MT10822로부터 조제한 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제를 코딩하는 ORF를 함유하는 플라스미드: pPT-DB1에, 실시예 86 또는 87에서 추출한 변이 도입 표적인 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 72번째의 Trp를 다른 아미노산으로 변환하기 위한 변이 도입을 행하였다.

<1119> 10ng의 pPT-DB1을 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 1은, 서열목록의 서열번호 127 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호 107에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초·어닐링(55℃) 30초·신장반응(72℃) 2분간의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 2는, MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호 108에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호 109에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 1과 동일한 조작에 의해 행하였다.

<1120> 이후, 실시예 89와 동일한 조작을 행하여 다수의 형질전환체를 얻었다. 상기 형질전환체로부터 각각 플라스미드를 조제하여, RNaseA를 30㎍ 가해 37℃에서 1시간 보온한 후, 페놀 추출/클로로포름 추출 및 에탄올 침전에 의해 DNA를 정제하여, 최종적으로 1.0㎍/㎕가 되도록 TE 용액에 용해시켰다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와

오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 염기 서열을 결정하였다.

<1121> 그 결과, 얻어진 형질전환체가 갖는 플라스미드는, pPT-DB1과 비교하여, 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 72번째의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열이 Trp 이외의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열로 변화한 것임이 판명되었다.

<1122> 하기 표 138에, 얻어진 형질전환체의 번호와 변이 개소·아미노산 서열의 변화·염기 서열의 변화와의 대응을 나타낸다.

표 138

<1123>

번호	변이 개소	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		변이 도입 전	변이 도입 후	변이 도입 전	변이 도입 후
No. 78	β-72번째	Trp	Phe	tgg	ttt

<1124> [실시예 106] 개변 효소 획득을 목적으로 한 변이 도입(19)

<1125> 실시예 83에서 MT10822로부터 조제한 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제를 코딩하는 ORF를 함유하는 플라스미드: pPT-DB1에, 실시예 86 또는 87에서 추출한 변이 도입 표적인 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 112번째의 Lys를 다른 아미노산으로 변환하기 위한 변이 도입을 행하였다.

<1126> 10ng의 pPT-DB1을 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 1은, 서열목록의 서열번호 128 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호 107에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초·어닐링(55℃) 30초·신장반응(72℃) 2분간의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 2는, MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호 108에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호 109에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 1과 동일한 조작에 의해 행하였다.

<1127> 이후, 실시예 89와 동일한 조작을 행하여 다수의 형질전환체를 얻었다. 상기 형질전환체로부터 각각 플라스미드를 조제하여, RNaseA를 30㎍ 가해 37℃에서 1시간 보온한 후, 페놀 추출/클로로포름 추출 및 에탄올 침전에 의해 DNA를 정제하여, 최종적으로 1.0㎍/㎕가 되도록 TE 용액에 용해시켰다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 염기 서열을 결정하였다.

<1128> 그 결과, 얻어진 형질전환체가 갖는 플라스미드는, pPT-DB1과 비교하여, 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 112번째의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열이 Lys 이외의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열로 변화한 것임이 판명되었다.

<1129> 하기 표 139에, 얻어진 형질전환체의 번호와 변이 개소·아미노산 서열의 변화·염기 서열의 변화와의 대응을 나타낸다.

표 139

<1130>

번호	변이 개소	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		변이 도입 전	변이 도입 후	변이 도입 전	변이 도입 후
No. 78a	β-112번째	Lys	Val	aag	gtg
No. 78b	β-112번째	Lys	Ile	aag	att

<1131> [실시예 107] 개변 효소 획득을 목적으로 한 변이 도입(20)

<1132> 실시예 83에서 MT10822로부터 조제한 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제를 코딩하는 ORF를 함유하는 플라스미드: pPT-DB1에, 실시예 86 또는 87에서 추출한 변이 도입 표적인 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 118번째의 Phe를 다른 아미노산으로 변환하기 위한 변이 도입을 행하였다.

<1133> 10ng의 pPT-DB1을 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 1은, 서열목록의 서열번호 129 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호 107에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초·어닐링(55℃) 30초·신장반응(72℃) 2분간의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 2는, MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호 108에 서열을

기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호 109에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50μL의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 1과 동일한 조작에 의해 행하였다.

<1134> 이후, 실시예 89와 동일한 조작을 행하여 다수의 형질전환체를 얻었다. 상기 형질전환체로부터 각각 플라스미드를 조제하여, RNaseA를 30㎍ 가해 37℃에서 1시간 보온한 후, 페놀 추출/클로로포름 추출 및 에탄올 침전에 의해 DNA를 정제하여, 최종적으로 1.0㎍/㎕가 되도록 TE 용액에 용해시켰다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 염기 서열을 결정하였다.

<1135> 그 결과, 얻어진 형질전환체가 갖는 플라스미드는, pPT-DB1과 비교하여, 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 118번째의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열이 Phe 이외의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열로 변화한 것임이 판명되었다.

<1136> 하기 표 140에, 얻어진 형질전환체의 번호와 변이 개소·아미노산 서열의 변화·염기 서열의 변화와의 대응을 나타낸다.

표 140

<1137>

번호	변이 개소	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		변이 도입 전	변이 도입 후	변이 도입 전	변이 도입 후
No. 79	β-118번째	Phe	Ala	ttc	gcc
No. 80	β-118번째	Phe	Leu	ttc	ctc
No. 81	β-118번째	Phe	Ile	ttc	atc
No. 82	β-118번째	Phe	Val	ttc	gtc

<1138> [실시예 108] 개변 효소 획득을 목적으로 한 변이 도입(21)

<1139> 실시예 83에서 MT10822로부터 조제한 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제를 코딩하는 ORF를 함유하는 플라스미드: pPT-DB1에, 실시예 86 또는 87에서 추출한 변이 도입 표적인 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 127번째의 Leu를 다른 아미노산으로 변환하기 위한 변이 도입을 행하였다.

<1140> 10ng의 pPT-DB1을 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 1은, 서열목록의 서열번호 130 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호 107에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초·어닐링(55℃) 30초·신장반응(72℃) 2분간의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 2는, MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호 108에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호 109에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 1과 동일한 조작에 의해 행하였다.

<1141> 이후, 실시예 89와 동일한 조작을 행하여 다수의 형질전환체를 얻었다. 상기 형질전환체로부터 각각 플라스미드를 조제하여, RNaseA를 30㎍ 가해 37℃에서 1시간 보온한 후, 페놀 추출/클로로포름 추출 및 에탄올 침전에 의해 DNA를 정제하여, 최종적으로 1.0㎍/㎕가 되도록 TE 용액에 용해시켰다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 염기 서열을 결정하였다.

<1142> 그 결과, 얻어진 형질전환체가 갖는 플라스미드는, pPT-DB1과 비교하여, 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 127번째의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열이 Leu 이외의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열로 변화한 것임이 판명되었다.

<1143> 하기 표 141에, 얻어진 형질전환체의 번호와 변이 개소·아미노산 서열의 변화·염기 서열의 변화와의 대응을 나타낸다.

표 141

<1144>

번호	변이 개소	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		변이 도입 전	변이 도입 후	변이 도입 전	변이 도입 후
No. 83	β-127번째	Leu	Ala	ctg	gcg
No. 84	β-127번째	Leu	Val	ctg	gtg
No. 85	β-127번째	Leu	Ser	ctg	tcg

<1145> [실시예 109] 개변 효소 획득을 목적으로 한 변이 도입(22)

<1146> 실시예 83에서 MT10822로부터 조제한 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제를 코딩하는 ORF를 함유하는 플라스미드: pPT-DB1에, 실시예 86 또는 87에서 추출한 변이 도입 표적인 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 146번째의 Arg을 다른 아미노산으로 변환하기 위한 변이 도입을 행하였다.

<1147> 10ng의 pPT-DB1을 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 1은, 서열목록의 서열번호 131 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호 107에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초·어닐링(55℃) 30초·신장반응(72℃) 2분간의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 2는, MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호 108에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호 109에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 1과 동일한 조작에 의해 행하였다.

<1148> 이후, 실시예 89와 동일한 조작을 행하여 다수의 형질전환체를 얻었다. 상기 형질전환체로부터 각각 플라스미드를 조제하여, RNaseA를 30㎍ 가해 37℃에서 1시간 보온한 후, 페놀 추출/클로로포름 추출 및 에탄올 침전에 의해 DNA를 정제하여, 최종적으로 1.0㎍/㎕가 되도록 TE 용액에 용해시켰다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 염기 서열을 결정하였다.

<1149> 그 결과, 얻어진 형질전환체가 갖는 플라스미드는, pPT-DB1과 비교하여, 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 146번째의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열이 Arg 이외의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열로 변화한 것임이 판명되었다.

<1150> 하기 표 142에, 얻어진 형질전환체의 번호와 변이 개소·아미노산 서열의 변화·염기 서열의 변화와의 대응을 나타낸다.

표 142

<1151>

번호	변이 개소	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		변이 도입 전	변이 도입 후	변이 도입 전	변이 도입 후
No. 86	β-146번째	Arg	Gly	cgg	ggg

<1152> [실시예 110] 개변 효소 획득을 목적으로 한 변이 도입(23)

<1153> 실시예 83에서 MT10822로부터 조제한 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제를 코딩하는 ORF를 함유하는 플라스미드: pPT-DB1에, 실시예 86 또는 87에서 추출한 변이 도입 표적인 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 150번째의 Ala를 다른 아미노산으로 변환하기 위한 변이 도입을 행하였다.

<1154> 10ng의 pPT-DB1을 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 1은, 서열목록의 서열번호 132 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호 107에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초·어닐링(55℃) 30초·신장반응(72℃) 2분간의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 2는, MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호 108에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호 109에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 1과 동일한 조작에 의해 행하였다.

<1155> 이후, 실시예 89와 동일한 조작을 행하여 다수의 형질전환체를 얻었다. 상기 형질전환체로부터 각각 플라스미드를 조제하여, RNaseA를 30㎍ 가해 37℃에서 1시간 보온한 후, 페놀 추출/클로로포름 추출 및 에탄올 침전에 의해 DNA를 정제하여, 최종적으로 1.0㎍/㎕가 되도록 TE 용액에 용해시켰다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 염기 서열을 결정하였다.

<1156> 결과, 얻어진 형질전환체가 갖는 플라스미드는 pPT-DB1과 비교하여, 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 150번째의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열이 Ala 이외의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열로 변화한 것임이 판명되었다.

<1157> 하기 표 143에, 얻어진 형질전환체의 번호와 변이 개소·아미노산 서열의 변화·염기 서열의 변화와의 대응을 나타낸다.

표 143

<1158>

번호	변이 개소	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		변이 도입 전	변이 도입 후	변이 도입 전	변이 도입 후
No. 86a	β-150번째	Ala	Ser	gcg	tcg
No. 86b	β-150번째	Ala	Asn	gcg	aat

<1159> [실시예 111] 개변 효소 획득을 목적으로 한 변이 도입(24)

<1160> 실시예 83에서 MT10822로부터 조제한 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제를 코딩하는 ORF를 함유하는 플라스미드: pPT-DB1에, 실시예 86 또는 87에서 추출한 변이 도입 표적인 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 160번째의 Arg을 다른 아미노산으로 변환하기 위한 변이 도입을 행하였다.

<1161> 10ng의 pPT-DB1을 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 1은, 서열목록의 서열번호 133 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호 107에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초·어닐링(55℃) 30초·신장반응(72℃) 2분간의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 2는, MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호 108에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호 109에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 1과 동일한 조작에 의해 행하였다.

<1162> 이후, 실시예 89와 동일한 조작을 행하여 다수의 형질전환체를 얻었다. 상기 형질전환체로부터 각각 플라스미드를 조제하여, RNaseA를 30㎍ 가해 37℃에서 1시간 보온한 후, 페놀 추출/클로로포름 추출 및 에탄올 침전에 의해 DNA를 정제하여, 최종적으로 1.0㎍/㎕가 되도록 TE 용액에 용해시켰다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 염기 서열을 결정하였다.

<1163> 그 결과, 얻어진 형질전환체가 갖는 플라스미드는, pPT-DB1과 비교하여, 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 160번째의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열이 Arg 이외의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열로 변화한 것임이 판명되었다.

<1164> 하기 표 144에, 얻어진 형질전환체의 번호와 변이 개소·아미노산 서열의 변화·염기 서열의 변화와의 대응을 나타낸다.

표 144

<1165>

번호	변이 개소	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		변이 도입 전	변이 도입 후	변이 도입 전	변이 도입 후
No. 87	β-160번째	Arg	Leu	cgg	ctg
No. 88	β-160번째	Arg	Trp	cgg	tgg
No. 88a	β-160번째	Arg	Met	cgg	atg
No. 88b	β-160번째	Arg	Cys	cgg	tgt

<1166> [실시예 112] 개변 효소 획득을 목적으로 한 변이 도입(25)

<1167> 실시예 83에서 MT10822로부터 조제한 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제를 코딩하는 ORF를 함유하는 플라스미드: pPT-DB1에, 실시예 86 또는 87에서 추출한 변이 도입 표적인 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 168번째의 Thr를 다른 아미노산으로 변환하기 위한 변이 도입을 행하였다.

<1168> 10ng의 pPT-DB1을 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 1은, 서열목록의 서열번호 134 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호 107에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초·어닐링(55℃) 30초·신장반응(72℃) 2분간의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 2는, MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호 108에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호 109에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 1과 동일한 조작에 의해 행하였다.

<1169> 이후, 실시예 89와 동일한 조작을 행하여 다수의 형질전환체를 얻었다. 상기 형질전환체로부터 각각 플라스미드를 조제하여, RNaseA를 30㎍ 가해 37℃에서 1시간 보온한 후, 페놀 추출/클로로포름 추출 및 에탄올 침전에 의

해 DNA를 정제하여, 최종적으로 1.0㎍/㎕가 되도록 TE 용액에 용해시켰다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 염기 서열을 결정하였다.

<1170> 그 결과, 얻어진 형질전환체가 갖는 플라스미드는, pPT-DB1과 비교하여, 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 168번째의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열이 Thr 이외의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열로 변화한 것임이 판명되었다.

<1171> 하기 표 145에, 얻어진 형질전환체의 번호와 변이 개소·아미노산 서열의 변화·염기 서열의 변화와의 대응을 나타낸다.

표 145

<1172>

번호	변이 개소	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		변이 도입 전	변이 도입 후	변이 도입 전	변이 도입 후
No. 88c	β-168번째	Thr	Glu	acg	gag

<1173> [실시예 113] 개변 효소 획득을 목적으로 한 변이 도입(26)

<1174> 실시예 83에서 MT10822로부터 조제한 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제를 코딩하는 ORF를 함유하는 플라스미드: pPT-DB1에, 실시예 86 또는 87에서 추출한 변이 도입 표적인 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 171번째의 Lys를 다른 아미노산으로 변환하기 위한 변이 도입을 행하였다.

<1175> 10ng의 pPT-DB1을 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 1은, 서열목록의 서열번호 135 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호 107에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초·어닐링(55℃) 30초·신장반응(72℃) 2분간의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 2는, MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호 108에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호 109에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 1과 동일한 조작에 의해 행하였다.

<1176> 이후, 실시예 89와 동일한 조작을 행하여 다수의 형질전환체를 얻었다. 상기 형질전환체로부터 각각 플라스미드를 조제하여, RNaseA를 30㎍ 가해 37℃에서 1시간 보온한 후, 페놀 추출/클로로포름 추출 및 에탄올 침전에 의해 DNA를 정제하여, 최종적으로 1.0㎍/㎕가 되도록 TE 용액에 용해시켰다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 염기 서열을 결정하였다.

<1177> 그 결과, 얻어진 형질전환체가 갖는 플라스미드는, pPT-DB1과 비교하여, 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 171번째의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열이 Lys 이외의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열로 변화한 것임이 판명되었다.

<1178> 하기 표 146에, 얻어진 형질전환체의 번호와 변이 개소·아미노산 서열의 변화·염기 서열의 변화와의 대응을 나타낸다.

표 146

<1179>

번호	변이 개소	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		변이 도입 전	변이 도입 후	변이 도입 전	변이 도입 후
No. 88d	β-171번째	Lys	Ala	aag	gcg

<1180> [실시예 114] 개변 효소 획득을 목적으로 한 변이 도입(27)

<1181> 실시예 83에서 MT10822로부터 조제한 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제를 코딩하는 ORF를 함유하는 플라스미드: pPT-DB1에, 실시예 86 또는 87에서 추출한 변이 도입 표적인 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 176번째의 Tyr를 다른 아미노산으로 변환하기 위한 변이 도입을 행하였다.

<1182> 10ng의 pPT-DB1을 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 1은, 서열목록의 서열번호 136 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호 107에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초·어닐링(55℃) 30초·신장반응(72℃) 2분간의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 2는, MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호 108에 서열을

기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호 109에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 1과 동일한 조작에 의해 행하였다.

<1183> 이후, 실시예 89와 동일한 조작을 행하여 다수의 형질전환체를 얻었다. 상기 형질전환체로부터 각각 플라스미드를 조제하여, RNaseA를 30㎍ 가해 37℃에서 1시간 보온한 후, 페놀 추출/클로로포름 추출 및 에탄올 침전에 의해 DNA를 정제하여, 최종적으로 1.0㎍/㎕가 되도록 TE 용액에 용해시켰다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 염기 서열을 결정하였다.

<1184> 그 결과, 얻어진 형질전환체가 갖는 플라스미드는, pPT-DB1과 비교하여, 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 176번째의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열이 Tyr 이외의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열로 변화한 것임이 판명되었다.

<1185> 하기 표 147에, 얻어진 형질전환체의 번호와 변이 개소·아미노산 서열의 변화·염기 서열의 변화와의 대응을 나타낸다.

표 147

<1186>

번호	변이 개소	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		변이 도입 전	변이 도입 후	변이 도입 전	변이 도입 후
No. 88e	β-176번째	Tyr	Ala	tac	gcc
No. 88f	β-176번째	Tyr	Met	tac	atg
No. 88g	β-176번째	Tyr	Cys	tac	tgc
No. 88h	β-176번째	Tyr	Thr	tac	acc

<1187> [실시예 115] 개변 효소 획득을 목적으로 한 변이 도입(28)

<1188> 실시예 83에서 MT10822로부터 조제한 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제를 코딩하는 ORF를 함유하는 플라스미드: pPT-DB1에, 실시예 86 또는 87에서 추출한 변이 도입 표적인 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 186번째의 Leu를 다른 아미노산으로 변환하기 위한 변이 도입을 행하였다.

<1189> 10ng의 pPT-DB1을 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 1은, 서열목록의 서열번호 137 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호 107에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초·어닐링(55℃) 30초·신장반응(72℃) 2분간의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 2는, MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호 108에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호 109에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 1과 동일한 조작에 의해 행하였다.

<1190> 이후, 실시예 89와 동일한 조작을 행하여 다수의 형질전환체를 얻었다. 상기 형질전환체로부터 각각 플라스미드를 조제하여, RNaseA를 30㎍ 가해 37℃에서 1시간 보온한 후, 페놀 추출/클로로포름 추출 및 에탄올 침전에 의해 DNA를 정제하여, 최종적으로 1.0㎍/㎕가 되도록 TE 용액에 용해시켰다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 염기 서열을 결정하였다.

<1191> 그 결과, 얻어진 형질전환체가 갖는 플라스미드는, pPT-DB1과 비교하여, 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 186번째의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열이 Leu 이외의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열로 변화한 것임이 판명되었다.

<1192> 하기 표 148에, 얻어진 형질전환체의 번호와 변이 개소·아미노산 서열의 변화·염기 서열의 변화와의 대응을 나타낸다.

표 148

<1193>

번호	변이 개소	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		변이 도입 전	변이 도입 후	변이 도입 전	변이 도입 후
No. 89	β-186번째	Leu	Glu	ctg	gag
No. 90	β-186번째	Leu	Asp	ctg	gat
No. 91	β-186번째	Leu	Lys	ctg	aag

No. 92	β-186번째	Leu	Arg	ctg	cgg
No. 93	β-186번째	Leu	Asn	ctg	aac
No. 94	β-186번째	Leu	Ser	ctg	tcg
No. 95	β-186번째	Leu	Gly	ctg	ggg

<1194> [실시예 116] 개변 효소 획득을 목적으로 한 변이 도입(29)

<1195> 실시예 83에서 MT10822로부터 조제한 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제를 코딩하는 ORF를 함유하는 플라스미드: pPT-DB1에, 실시예 86 또는 87에서 추출한 변이 도입 표적인 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 217번째의 Asp를 다른 아미노산으로 변환하기 위한 변이 도입을 행하였다.

<1196> 10ng의 pPT-DB1을 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 1은, 서열목록의 서열번호 138 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호 107에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초·어닐링(55℃) 30초·신장반응(72℃) 2분간의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 2는, MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호 108에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호 109에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 1과 동일한 조작에 의해 행하였다.

<1197> 이후, 실시예 89와 동일한 조작을 행하여 다수의 형질전환체를 얻었다. 상기 형질전환체로부터 각각 플라스미드를 조제하여, RNaseA를 30㎍ 가해 37℃에서 1시간 보온한 후, 페놀 추출/클로로포름 추출 및 에탄올 침전에 의해 DNA를 정제하여, 최종적으로 1.0㎍/㎕가 되도록 TE 용액에 용해시켰다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 염기 서열을 결정하였다.

<1198> 그 결과, 얻어진 형질전환체가 갖는 플라스미드는, pPT-DB1과 비교하여, 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 217번째의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열이 Asp 이외의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열로 변화한 것임이 판명되었다.

<1199> 하기 표 149에, 얻어진 형질전환체의 번호와 변이 개소·아미노산 서열의 변화·염기 서열의 변화와의 대응을 나타낸다.

표 149

<1200>

번호	변이 개소	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		변이 도입 전	변이 도입 후	변이 도입 전	변이 도입 후
No. 96	β-217번째	Asp	Gly	gac	ggc
No. 96a	β-217번째	Asp	Val	gac	gtc
No. 96b	β-217번째	Asp	Leu	gac	ctc
No. 96c	β-217번째	Asp	Met	gac	atg
No. 96d	β-217번째	Asp	Cys	gac	tgt
No. 96e	β-217번째	Asp	Ser	gac	agc
No. 96f	β-217번째	Asp	Thr	gac	acc
No. 96g	β-217번째	Asp	His	gac	cac

<1201> [실시예 117] 개변 효소 획득을 목적으로 한 변이 도입(30)

<1202> 실시예 83에서 MT10822로부터 조제한 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제를 코딩하는 ORF를 함유하는 플라스미드: pPT-DB1에, 실시예 86 또는 87에서 추출한 변이 도입 표적인 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 218번째의 Cys를 다른 아미노산으로 변환하기 위한 변이 도입을 행하였다.

<1203> 10ng의 pPT-DB1을 주형으로 하여, 2종류의 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응 1은, 서열목록의 서열번호 139 기재의 프라이머 및 M13 프라이머 M4(서열목록의 서열번호 107에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, 열변성(98℃) 15초·어닐링(55℃) 30초·신장반응(72℃) 2분간의 조건을 25 사이클 반복함으로써 행하였다. PCR 반응 2는, MUT4 프라이머(서열목록의 서열번호 108에 서열을 기재) 및 M13 프라이머 RV(서열목록의 서열번호 109에 서열을 기재)를 각각 50pmol 포함하는 전체량 50㎕의 계(조성은 키트에 기재된 조건에 따름)에서, PCR 반응 1과 동일한 조작에 의해 행하였다.

<1204> 이후, 실시예 89와 동일한 조작을 행하여 다수의 형질전환체를 얻었다. 상기 형질전환체로부터 각각 플라스미드를 조제하여, RNaseA를 30㎍ 가해 37℃에서 1시간 보온한 후, 페놀 추출/클로로포름 추출 및 에탄올 침전에 의해 DNA를 정제하여, 최종적으로 1.0㎍/㎕가 되도록 TE 용액에 용해시켰다. 이어서, ABI사 제조의 시퀀싱 키트와 오토시퀀서 373A를 이용한 디데옥시법에 따라 염기 서열을 결정하였다.

<1205> 그 결과, 얻어진 형질전환체가 갖는 플라스미드는, pPT-DB1과 비교하여, 슈도노카르디아 서모필라 JCM3095 유래의 니트릴히드라타제의 β-서브유닛의 아미노산 서열 중의 218번째의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열이 Cys 이외의 아미노산을 코딩하는 코돈에 상당하는 염기 서열로 변화한 것임이 판명되었다.

<1206> 하기 표 150에, 얻어진 형질전환체의 번호와 변이 개소·아미노산 서열의 변화·염기 서열의 변화와의 대응을 나타낸다.

표 150

<1207>

번호	변이 개소	아미노산 서열의 변화		염기 서열의 변화	
		변이 도입 전	변이 도입 후	변이 도입 전	변이 도입 후
No. 96h	β-218번째	Cys	Met	tgc	atg
No. 96i	β-218번째	Cys	Ser	tgc	tcc

<1208> [실시예 118] 개변 전의 니트릴히드라타제와 개변 후의 개변 효소와의 형질 비교(1)

<1209> 500mL의 배플 부착형 삼각 플라스크에 40㎍/㎖의 황산제이철·칠수화물 및 10㎍/㎖의 염화코발트·육수화물을 함유하는 100mL의 LB 액체 배지를 5개 조제하여, 121℃·20분간 오토클레이브에 의해 멸균하였다. 각각의 배지에 최종 농도가 100㎍/㎖가 되도록 암피실린을 첨가하였다.

<1210> 각각의 배지에 실시예 84에서 얻어진 형질전환체 No. 200과 실시예 88에서 얻어진 형질전환체 No. 201 내지 204의 합계 5 종류의 형질전환체를 1종류씩 각각 5개의 배지에 1백금이 접종하였다. 37℃·130rpm으로 약 20시간 배양한 후, 각각의 배양 종료액으로부터 원심분리(5000G × 15분간)에 의해 각 형질전환체를 분리하였다. 이어서, 분리한 각 형질전환체를 50mL의 생리 식염수에 각각 재현탁한 후에, 한번 더 원심분리(5000G × 15분간)에 의해 각 형질전환체를 분리하였다.

<1211> 각 형질전환체 0.1g을 20mL의 50mM 인산칼륨 수용액(pH7.0)에 각각 현탁한 후, 10mL ×2개로 분주하였다. 따라서, 각 형질전환체당 2개, 합계 10개의 현탁액이 준비되었다. 각 형질전환체의 현탁액 1개에는 1mL의 아크릴로니트릴을, 또 1개에는 메타크릴로니트릴을 첨가하여, 30℃에서 서서히 교반하면서 10분간 반응시켰다.

<1212> 반응 종료후, HPLC를 이용하여 각 반응 종료액의 분석을 행한 결과, 각 액 중에는 반응할 수 없었던 기질인 니트릴 화합물(아크릴로니트릴 또는 메타크릴로니트릴)과 반응에 의해 생긴 생성물인 대응하는 아미드 화합물(아크릴아미드 또는 메타크릴아미드)이 존재하고 있었다. 또한, 대응하는 유기산(아크릴산 또는 메타크릴산)의 존재는 확인되지 않았다.

<1213> 각 형질전환체에, 아크릴로니트릴을 기질로 하는 반응에서 생성한 아크릴아미드와 메타크릴로니트릴을 기질로 하는 반응에서 생성한 메타크릴아미드와의 몰 비를 비교한 결과, 하기 표 151에 나타내는 바와 같은 차이가 관찰되었다. 아크릴로니트릴과 메타크릴로니트릴을 비교한 경우, 메타크릴로니트릴 쪽이 벌크한 니트릴 화합물인 점에서, 이 결과는 보다 벌크한 기질을 수화하기 쉬워진 개변 효소가 얻어진 것을 나타내고 있다.

표 151

<1214>

번호	β-48번째의 아미노산 (염기 서열)	수화 활성비(상대비) [메타크릴로니트릴을 기질로 한 경우] ÷ [아크릴로니트릴을 기질로 한 경우]
No. 200	Trp(tgg)	0.41(100%)
No. 201	Tyr(tat)	0.87(211%)
No. 202	Val(gtg)	0.79(192%)
No. 203	Ala(gcg)	0.67(163%)
No. 204	Gly(ggg)	0.82(198%)

<1215> [실시예 119] 개변 전의 니트릴히드라타제와 개변 후의 개변 효소와의 형질 비교(2)

<1216> 500mL의 배플 부착형 삼각 플라스크에 40㎍/㎖의 황산제이철·칠수화물 및 10㎍/㎖의 염화코발트·육수화물을 함유하는 100mL의 LB 액체 배지를 57개 조제하여, 121℃·20분간 오토클레이브에 의해 멸균하였다. 각각의 배지에 최종 농도가 100㎍/㎖가 되도록 암피실린을 첨가하였다.

<1217> 각각의 배지에, pPT-DB1에 의해 HB101를 형질전환하여 얻어진 형질전환체 No. 0과 실시예 89 내지 117에서 얻어진 형질전환체 중, No. 40, No. 40e, No. 40f, No. 42, No. 42a, No. 43, No. 44, No. 45, No. 46, No. 47, No. 48, No. 49, No. 50, No. 51, No. 52, No. 54, No. 55, No. 56, No. 57, No. 58, No. 59, No. 60, No. 61, No. 62, No. 63, No. 64, No. 65, No. 66, No. 67, No. 68, No. 69, No. 70, No. 71, No. 72, No. 73, No. 74, No. 75, No. 76, No. 77, No. 78, No. 79, No. 80, No. 81, No. 82, No. 83, No. 84, No. 85, No. 87, No. 88, No. 89, No. 90, No. 91, No. 92, No. 93, No. 94, No. 95의 합계 56 종류의 형질전환체를 1종류씩을 각각의 배지에 1백금이 접종하였다. 37℃·130rpm으로 약 20시간 배양한 후, 각각의 배양 종료액으로부터 원심분리(5000G × 15분간)에 의해 각 형질전환체를 분리하였다. 이어서, 분리한 각 형질전환체를 50mL의 생리식염수에 각각 재현탁한 후에, 한번 더 원심분리(5000G × 15분간)에 의해 각 형질전환체를 분리하였다.

<1218> 각 형질전환체 0.1g을 20mL의 50mM 인산칼륨 수용액(pH7.0)에 각각 현탁한 후, 10mL × 2개로 분주하였다. 따라서 각 형질전환체당 2개, 합계 112개의 현탁액이 준비되었다. 각 형질전환체의 현탁액 1개에는 1mL의 아크릴로니트릴을, 또 1개에는 메타크릴로니트릴을 첨가하여, 20℃에서 서서히 교반하면서 10분간 반응시켰다.

<1219> 반응 종료후, HPLC를 이용하여 각 반응 종료액의 분석을 행한 결과, 각 액 중에는 반응할 수 없었던 기질인 니트릴 화합물(아크릴로니트릴 또는 메타크릴로니트릴)과, 반응에 의해 생긴 생성물인 대응하는 아미드 화합물(아크릴아미드 또는 메타크릴아미드)이 존재하고 있었다. 또한, 대응하는 유기산(아크릴산 또는 메타크릴산)의 존재는 확인되지 않았다.

<1220> 각 형질전환체에, 아크릴로니트릴을 기질로 하는 반응에서 생성한 아크릴아미드와 메타크릴로니트릴을 기질로 하는 반응에서 생성한 메타크릴아미드와의 몰 비를 비교한 결과, 하기 표 152, 표 153 및 표 154에 나타내는 바와 같은 다양성이 관찰되었다. 아크릴로니트릴과 메타크릴로니트릴의 벌크성을 비교한 경우, 메타크릴로니트릴 쪽이 벌크한 니트릴 화합물이다. 이 결과는, 개변 전의 니트릴히드라타제와 비교하여, 기질 특이성이 변화한 개변 효소가 얻어진 것을 나타내고 있다.

표 152

<1221>

번호	수화 활성비(상대비) [메타크릴로니트릴이 기질인 경우] ÷ [아크릴로니트릴이 기질인 경우]	수화 활성비(상대비) [아크릴로니트릴이 기질인 경우] ÷ [메타크릴로니트릴이 기질인 경우]
No. 0	0.189(100%)	5.29(100%)
No. 40	0.219(116%)	4.55(86%)
No. 40e	0.211(112%)	4.71(89%)
No. 40f	0.206(109%)	4.87(92%)
No. 42	0.200(106%)	4.97(94%)
No. 42a	0.202(107%)	4.92(93%)
No. 43	0.185(98%)	5.40(102%)
No. 44	0.185(98%)	5.40(102%)
No. 45	0.187(99%)	5.34(101%)
No. 46	0.185(98%)	5.40(102%)
No. 47	0.181(96%)	5.50(104%)
No. 48	0.187(99%)	5.34(101%)
No. 49	0.208(110%)	4.81(91%)
No. 50	0.198(105%)	5.03(95%)
No. 51	0.187(99%)	5.34(101%)
No. 52	0.202(107%)	4.92(93%)
No. 54	0.153(81%)	6.51(123%)
No. 55	0.159(84%)	6.30(119%)

No. 56	0.204(108%)	4.92(93%)
No. 57	0.168(89%)	5.92(112%)

표 153

<1222>

번호	수화 활성비(상대비) [메타크릴로니트릴이 기질인 경우] ÷ [아크릴로니트릴이 기질인 경우]	수화 활성비(상대비) [아크릴로니트릴이 기질인 경우] ÷ [메타크릴로니트릴이 기질인 경우]
No. 58	0.159(84%)	6.30(119%)
No. 59	0.183(97%)	5.45(103%)
No. 60	0.160(85%)	6.24(118%)
No. 61	0.195(103%)	5.13(97%)
No. 62	0.210(111%)	4.76(90%)
No. 63	0.198(105%)	5.03(95%)
No. 64	0.155(82%)	6.45(122%)
No. 65	0.206(109%)	4.87(92%)
No. 66	0.180(95%)	5.55(105%)
No. 67	0.172(91%)	5.82(110%)
No. 68	0.399(211%)	2.49(47%)
No. 69	0.259(137%)	3.86(73%)
No. 70	0.212(112%)	4.71(89%)
No. 71	0.223(118%)	4.50(85%)
No. 72	0.206(109%)	4.87(92%)
No. 73	0.229(121%)	4.39(83%)
No. 74	0.233(123%)	4.28(81%)
No. 75	0.204(108%)	4.92(93%)
No. 76	0.191(101%)	5.24(99%)
No. 77	0.271(142%)	3.70(70%)

표 154

<1223>

번호	수화 활성비(상대비) [메타크릴로니트릴이 기질인 경우] ÷ [아크릴로니트릴이 기질인 경우]	수화 활성비(상대비) [아크릴로니트릴이 기질인 경우] ÷ [메타크릴로니트릴이 기질인 경우]
No. 78	0.268(137%)	3.86(73%)
No. 79	0.170(90%)	5.87(111%)
No. 80	0.183(97%)	5.45(103%)
No. 81	0.180(95%)	5.56(105%)
No. 82	0.164(87%)	6.08(115%)
No. 83	0.174(92%)	5.77(109%)
No. 84	0.208(110%)	4.81(91%)
No. 85	0.164(87%)	6.08(115%)
No. 87	0.176(93%)	5.71(108%)
No. 88	0.166(88%)	6.03(114%)
No. 89	0.191(101%)	5.24(99%)
No. 90	0.197(104%)	5.08(96%)
No. 91	0.187(99%)	5.34(101%)
No. 92	0.185(98%)	5.40(102%)
No. 93	0.187(99%)	5.34(101%)

No. 94	0.193(102%)	5.18(98%)
No. 95	0.187(99%)	5.34(101%)

도면의 간단한 설명

<1224> 도 1은 MT10822로부터 추출한 플라스미드 pPT-DB1의 제한 효소 절단점 지도이다(참고예 1, 실시예 1, 83).

<1225> 도 2는 로도코커스 로도크로우스 J-1주 유래의 니트릴히드라타제를 활성 발현시키기 위해 구축한 플라스미드 pJ1H-DB1의 제한 효소 절단점 지도이다(실시예 84).

<1226> 도 1 및 도 2 중에서 사용되는 약호는 이하의 의미를 나타낸다.

<1227> bla: β-락타마제를 코딩하는 ORF를 나타낸다.

<1228> ColE1-ori: ColE1계의 복제 개시 부위를 나타낸다.

<1229> lacZ: pUC18 유래의 락토스 오페론의 프로모터 및 오퍼레이터 영역을 나타낸다.

<1230> NHα: 슈도노카르디아 서모필라 유래의 니트릴히드라타제의 α-서브유닛을 코딩하는 ORF를 나타낸다.

<1231> NHβ: 슈도노카르디아 서모필라 유래의 니트릴히드라타제의 β-서브유닛을 코딩하는 ORF를 나타낸다.

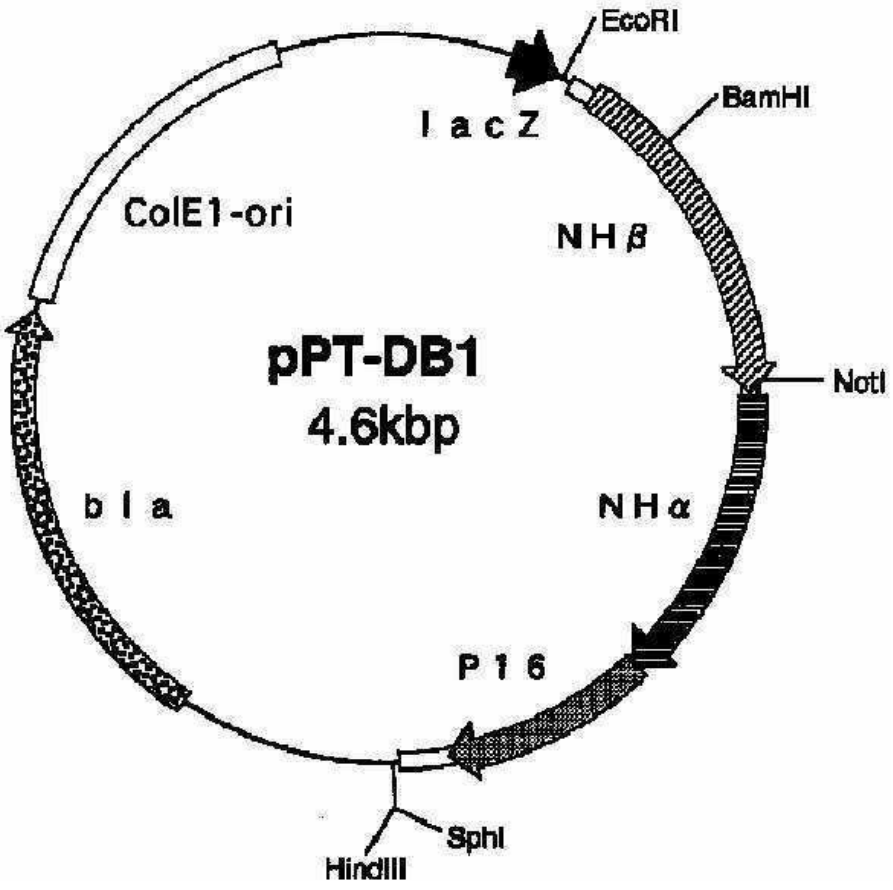
<1232> P16: 슈도노카르디아 서모필라 유래의 니트릴히드라타제의 활성화에 관여하는 것을 특징으로 하는 단백질을 코딩하는 ORF를 나타낸다.

<1233> nhhA: 로도코커스 로도크로우스 J-1주 유래의 니트릴히드라타제의 α-서브유닛을 코딩하는 ORF를 나타낸다.

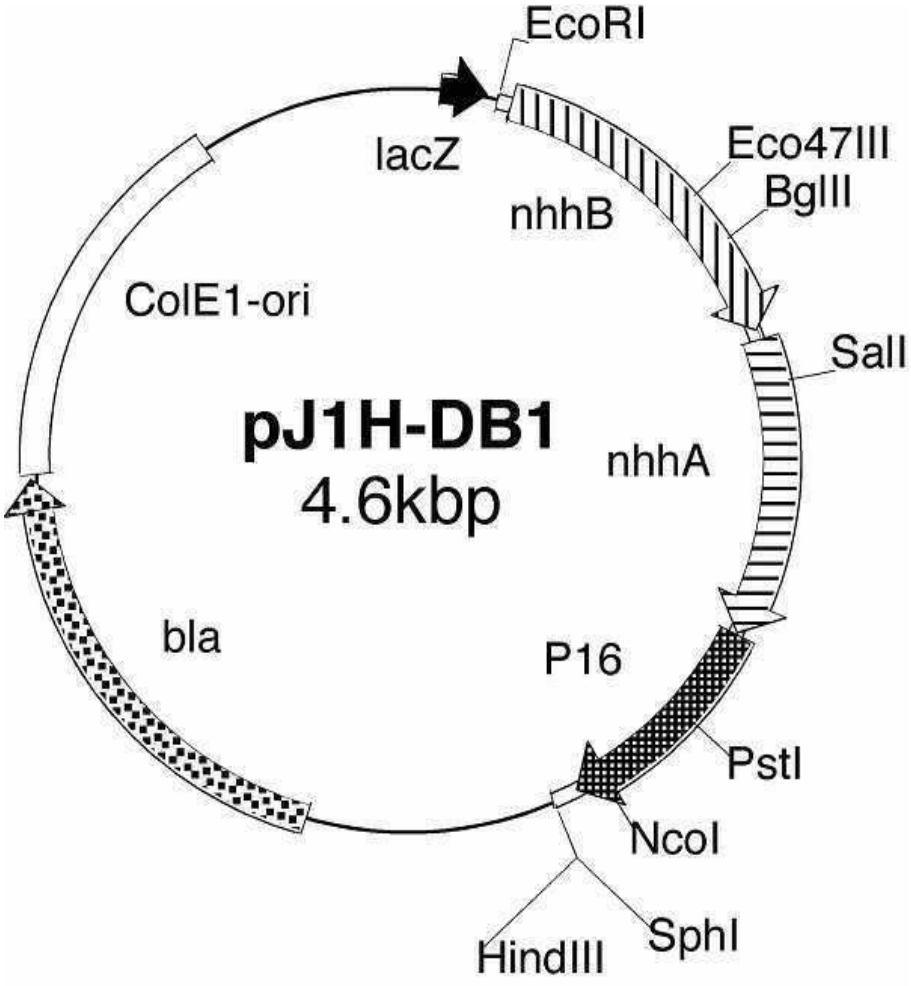
<1234> nhhB: 로도코커스 로도크로우스 J-1주 유래의 니트릴히드라타제의 β-서브유닛을 코딩하는 ORF를 나타낸다.

도면

도면1



도면2



서 열 목 록

서열목록 전자파일 첨부