(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4057055号
(P4057055)

(45)発行日　平成20年3月5日(2008.3.5)　(24)登録日　平成19年12月21日(2007.12.21)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21	
C12N 9/26	(2006.01)	C12N	9/26	Z
C12P 19/18	(2006.01)	C12P	19/18	
C12R 1/09	(2006.01)	C12N	1/21	

請求項の数 30　(全 100 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平8-531413
(86)(22)出願日　平成8年4月22日(1996.4.22)
(65)公表番号　特表平11-503906
(43)公表日　平成11年4月6日(1999.4.6)
(86)国際出願番号　PCT/DK1996/000179
(87)国際公開番号　WO1996/033267
(87)国際公開日　平成8年10月24日(1996.10.24)
審査請求日　平成15年4月11日(2003.4.11)
(31)優先権主張番号　0477/95
(32)優先日　平成7年4月21日(1995.4.21)
(33)優先権主張国　デンマーク(DK)
(31)優先権主張番号　1173/95
(32)優先日　平成7年10月17日(1995.10.17)
(33)優先権主張国　デンマーク(DK)

(73)特許権者
ノボザイムス　アクティーゼルスカブ
デンマーク国、デーコー－２８８０　バグスバエルト、クロシェイバイ　３６
(74)代理人
弁理士　石田　敬
(74)代理人
弁理士　鶴田　準一
(74)代理人
弁理士　福本　積
(74)代理人
弁理士　日野　あけみ
(74)代理人
弁理士　中村　和広

最終頁に続く

(54)【発明の名称】シクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼ変異体

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
表１に記載の番号付けに従って、Y89D、*145aI、S146P、N193G、D371N、P143GとA144RとS145W、及び143-151（GRAGTNPG）からなる群から選択される少なくとも１個の変異を含むシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ（CGTase）変異体。
【請求項２】
表１に記載の番号付けに従って、S145A、E146S、及びF195Yと87-94（IKYSG-VNN）と143-151（GRAGTNPG）からなる群から選択される少なくとも１個の変異を含むシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ（CGTase）変異体。
【請求項３】
変異Y89Dを有する請求項１に記載のCGTase変異体。
【請求項４】
変異Y89DとS146Pを有する請求項１に記載のCGTase変異体。
【請求項５】
変異*145aIを有する請求項１に記載のCGTase変異体。
【請求項６】
変異S146Pを有する請求項１に記載のCGTase変異体。
【請求項７】
変異N193Gを有する請求項１に記載のCGTase変異体。
【請求項８】

変異Y89GとN193Gを有する請求項１に記載のCGTase変異体。
【請求項９】
変異Q148EとN193Gを有する請求項１に記載のCGTase変異体。
【請求項１０】
変異D371Nを有する請求項１に記載のCGTase変異体。
【請求項１１】
変異P143GとA144RとS145Wを有する請求項１に記載のGCTase変異体。
【請求項１２】
変異143-151（GRAGTNPG）を有する請求項１に記載のCGTase変異体。
【請求項１３】
変異F195Yと143-151（GRAGTNPG）を有する請求項１に記載のCGTase変異体。
【請求項１４】
変異S145Aを有する請求項２に記載のCGTase変異体。
【請求項１５】
変異E146Sを有する請求項２に記載のCGTase変異体。
【請求項１６】
変異F195Yと87-94（IKYSG-VNN）と143-151（GRAGTNPG）を有する請求項２に記載のCGTase変異体。
【請求項１７】
前記CGTaseが、バチルス（Bacillus）の株、又はサーモアナエロバクター（Thermoanaerobacter）の株に由来する、請求項１～16のいずれか１項に記載のに記載のCGTase変異体。
【請求項１８】
前記CGTaseが、バチルス・サーキュランス（Bacillus circulans）の株に由来する、請求項17に記載のCGTase変異体。
【請求項１９】
前記CGTaseが、バチルス・サーキュランス株251の株に由来する、請求項18に記載のCGTase変異体。
【請求項２０】
前記CGTaseが、サーモアナエロバクター種ATCC 53627の株に由来する、請求項17に記載のCGTase変異体。
【請求項２１】
請求項１～20のいずれか１項に記載のCGTase変異体をコードするDNA構成物。
【請求項２２】
請求項21に記載のDNA構成物を含む組換え発現ベクター。
【請求項２３】
請求項21に記載のDNA構成物又は請求項22に記載の組換え発現ベクターを含む宿主細胞。
【請求項２４】
請求項１～20のいずれか１項に記載のCGTase変異体の製造方法であって、該CGTase変異体の生産を許容する条件下で請求項23に記載の細胞を培養し、そしてその培養物から酵素を回収することを含む方法。
【請求項２５】
シクロデキストリンの製造工程における請求項１～20のいずれか１項に記載のCGTase変異体の使用方法。
【請求項２６】
α－，β－もしくはγ－シクロデキストリン、又はそれらの混合物の製造工程におけるCGTase変異体の請求項25に記載の使用方法。
【請求項２７】
直鎖オリゴサッカリドの製造工程における請求項１～20のいずれか１項に記載のCGTase変異体の使用方法。
【請求項２８】

シクロデキストリンのイン・シトウ形成（in situ generation）のための方法における請求項1～20のいずれか１項に記載のCGTase変異体の使用方法。
【請求項２９】
焼き製品（baked product）の製造工程における請求項1～20のいずれか１項に記載のCGTase変異体の使用方法。
【請求項３０】
化学製品に製造の間、この化学製品を安定化するための方法における請求項１～20のいずれか１項に記載のCGTase変異体の使用方法。
【発明の詳細な説明】
技術分野
本発明は、シクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼの変異体に関する。更に詳しくは、本発明は、前駆体CGTase酵素の基質結合及び／又は生成物選択性を改良する方法、並びにその基質に近い位置を保持する１又は複数のアミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失により前駆体CGTase酵素から得られるCGTase変異体に関する。更に、本発明は、CGTase変異体をコードするDNA構造物、発現ベクター、宿主細胞及び本発明のCGTase変異体を生産する方法に関する。
背景技術
以下、CGTaseと呼ばれるシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ又はシクロデキストリングリコシルトランスフェラーゼとも呼ばれるシクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼ（Ｅ．Ｃ．２．４．１．19）は、分子トランスグリコシル化反応によりデンプン及び同様の基質のシクロマルトデキストリンへの転化を触媒し、それにより、種々の大きさの以後シクロデキストリン（又はCD）と呼ばれるシクロマルトデキストリンを形成する。商業的に最も重要なのは、各々α－，β－，γ－シクロデキストリンと呼ばれる６，７及び８グルコース単位のシクロデキストリンである。商業的にあまり重要でないのは、各々δ－，ε－及びζ－シクロデキストリンと呼ばれる９，10、及び11グルコース単位のシクロデキストリンである。
これによりシクロデキストリンは疎水性内部空洞を有する環式グルコースオリゴマーである。それらは水溶液中で多くの小さな疎水性分子と包接複合体を形成し、それにより物理特徴の変化、例えば溶解度及び安定性の増加並びに化学反応性及び揮発性の減少を生ずる。シクロデキストリンは、特に食物、化粧品、化学及び医薬工業に適用される。
ほとんどのCGTaseはデンプン分解活性及びトランスグリコシル化活性の両方を有する。特定のCGTaseは主にα－シクロデキストリンを作り出し、特定のCGTaseは主にβ－シクロデキストリンを作り出すが、CGTaseは通常、α－，β－及びγ－シクロデキストリンの混合物を形成する。有機溶媒での選択的沈殿ステップは、別個のα－，β－及びγ－シクロデキストリンの単離のために用いることができる。高価な及び環境に有害な手順を避けるために、増加された比の１つの特定の型のシクロデキストリンを生産することができるCGTaseの利用性が要求される。
バチルス（Bacillus）、ブレビバクテリウム（Brevibacterium）、クロストリジウム（Clostridium）、コリネバクテリウム（Corynebacterium）、クレブシエラ（Klebsiella）、ミクロコッカス（Micrococcus）、サーモアナエロバクター（Thermoanaerobacter）及びサーモアナエロバクテリウム（Thermoanaerobacterium）から得られたCGTaseを含む異なるバクテリアソースからのCGTaseが文献に記載されている。
これにより、Kimuraら［Kimura K, Kataoka S, Ishii, Y, Takano T and Yamane K；J. Bacteriol. 1987 169 4399-4402］はバチルス種（Bacillus sp.）1011 CGTaseを記載し、Kanekoら［Kaneko T, Hamamoto T and Horikoshi K；J. Gen. Microbiol. 1988 134 97-105］はバチルス種（Bacillus sp.）株38-2 CGTaseを記載し、Kanekoら［Kaneko T, Song K B, Hamamoto T, Kudo T and Horikoshi K；J. Gem. Microbiol. 1989 135 3447-3457］はバチルス種（Bacillus sp.）株17-1 CGTaseを記載し、Itkorら［Itkor P, Tsukagoshi N and Udaka S；Biochem. Biophys. Res. Commum. 1990 166 630-636］はバチルス種（Bacillus sp.）B1018 CGTaseを記載し、Schmidら［Schmid G, Englbrecht A, Schmid D；Proc

eedings of the Fourth International Symposium on Cyclodextrins (Huber O, Szejtli J. Eds.), 1988 71-76] はバチルス種 (Bacillus sp.) 1-1 CGTaseを記載し、Kitamotoら [Kitamoto N, Kimura T, Kito Y, Ohmiya K; J. Ferment. Bioeng. 1992 74 345-351] はバチルス種 (Bacillus sp.) KC201 CGTaseを記載し、Sakaiら [Sakai S, Kubota M, Nakada T, Torigoe K, Ando O and Sugimoto T; J. Jpn. Soc. Starch. Sci. 1987 34 140-147] はバチルス・ステアロサーモフィルス (Bacillus stearothermophilus) CGTase及びバチルス・マセランス (Bacillus macerans) CGTaseを記載し、Takanoら [Takano T, Fukuda M, Monma M, Kobayashi S, Kainuma K and Yamane K; J. Bacteriol. 1986 166 (3) 1118-1122] はバチルス・マセランス (Bacillus macerans) CGTaseを記載し、Sinら [Sin K A, Nakamura A, Kobayashi K, Masaki H and Uozumi T; Appl. Microbiol. Biotechnol. 1991 35 600-605] はバチルス・オーベンシス (Bacillus ohbensis) CGTaseを記載し、Nitschkeら [Nitschke L, Heeger K, Bender H and Schultz G; Appl. Microbiol. Biotechnol. 1990 33 542-546] はバチルス・サーキュランス (Bacillus circulans) CGTaseを記載し、Hillら [Hill D E, Aldape R and Rozzell J D; Nucleic Acids Res. 1990 18 199] はバチルス・リケニホルミス (Bacillus licheniformis) CGTaseを記載し、Tomitaら [Tomita K, Kaneda M, Kawamura K and Nakanishi K; J. Ferm. Bioeng. 1993 75 (2) 89-92] はバチルス・アウトリチクス (Bacillus autolyticus) CGTaseを記載し、Jamunaら [Jamuna R, Saswathi N, Sheela R and Ramakrishna S V; Appl. Biochem. Biotechnol. 1993 43 163-176] はバチルス・セレウス (Bacillus cereus) CGTaseを記載し、Akimaruら [Akimaru K, Yagi T and Yamamoto S; J. ferm. Bioeng. 1991 71 (5) 322-328] はバチルス・コアギュランス (Bacillus coagulans) CGTaseを記載し、Schmid G [Schmid G; New Trends in Cyclodextrins and Derivatives (Duchene D, Ed.), Editions de Sante, Paris, 1991, 25-54] はバチルス・フィルムス (Bacillus firmus) CGTaseを記載し、Abelianら [Abelian V A, Adamian M O, Abelian L A A, Balayan A M and Afrikian E K; Biochememistry (Moscow) 1995 60 (6) 665-669] はバチルス・ハロフィルス (Bacillus halophilus) CGTaseを記載し、そしてKatoら [Kato T and Horikoshi K; J. Jpn. Soc. Starch Sci. 1986 33 (2) 137-143] はバチルス・サブチリス (Bacillus subtilis) CGTaseを記載する。

EP 614971はブレビバクテリウム (Brevibacterium) CGTaseを記載し、Haeckel及びBahl [Haeckel K, Bahl H; FEMS Microbiol. Lett. 1989 60 333-338] はクロストリジウム・サーモスルフロゲネス (Clostridium thermosulfurogenes) CGTaseを記載し、Podkovyrov及びZeikus [Podkovyrov S M, Zeikus J G; J. Bacteriol. 1992 174 5400-5405] はクロストリジウム・サーモヒドロスルフリクム (Clostridium thermohydrosulfuricum) CGTaseを記載し、JP 7000183はコリネバクテリウム (Corynebacterium) CGTaseを記載し、Binderら

[Binder F, Huber O and Böck A ; Gene 1986 47 269-277]

はクレブシエラ・ネウモニアエ (Klebsiella pneumoniae) CGTaseを記載し、US 4,317,881はマイクロコッカス (Micrococcus) CGTaseを記載し、そしてWindら [Wind R D, Liebl W, Buitelaar R M, Penninga D, Spreinat A, Dijkhuizen L, Bahl H; Appl. Environ. Microbiol. 1995 61 (4) 1257-1265] はサーモアナエロバクテリウム・サーモスルフリゲネス (Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes) CGTaseを記載する。

サーモアナエロバクター種 (Thermoanaerobacter sp.) により生産されたCATaseは、Normand及び

Jørgensen [Norman B E, Jørgensen S T ; Denpun Kagaku 1992, 39, 99-106 及びWO89/03421]

により報告されるが、そのアミノ酸配列はまだ開示されていない。本明細書において、我々はサーモアナエロバクター種CGTaseをコードするヌクレオチド (配列番号：１) 及びそのアミノ酸配列 (配列番号：２) を報告する。

また、好熱性放射菌類（Actinomycetes）からのCGTaseは［Abelian V A, Afyan K B, Avakian Z G, Melkumyan A G及びAfrikian E G；Biochemistry（Moscow）1995, 60（10）1223-1229］に報告されている。
現在、タンパク質工学は、幾分かの特定のシクロデキストリンを選択的に生産するために特定のCGTaseを改良するために用いられている。
CGTaseの構造
CGTaseはα－アミラーゼに機能的に関連している。CGTase及びα－アミラーゼは両方ともα－（１，４）－グリコシド結合の加水分解によりデンプンを分解するのが、実質的に排他的に各々環式及び直鎖状生成物を生産する。
CGTaseファミリーのメンバーは高い全アミノ酸配列の同一性、60％超を有する。CGTase及びα－アミラーゼは約30％のアミノ酸同一性を有する。しかしながら、Ａ及びＢドメインの間に位置したCGTase及びα－アミラーゼの活性部位の裂け目（Asp229, Glu257及びAsp328）はむしろ類似している。
現在、CGTaseの三次構造が決定されている。これにより、Hofmanら［Hofman B E, Bender H, Schultz G E；J. Mol. Biol. 1989 209 793-800］並びにKlein及びSchulz［Klein C, Schulz G E；J. Mol. Biol. 1991 217 737-750］はバチルス・サーキュランス（Bacillus circulans）Strain 8由来のCGTaseの三次構造を報告し、Kubotaら［Kubota M, Matsuura Y, Sakai S and Katsube Y；Denpun Kagaku 1991 38 141-146］は、バチルス・ステアロサーモフィルス（Bacillus stearothermophilus）TC-91由来のCGTaseの三次構造を報告し、Lawsonら［Lawson C L, van Montfort R, Strokopytov B, Rozeboom H J, Kalk K H, de Vries G E, Penninga D, Dijkhuizen L, and Dijkstra B W；J. Mol. Biol. 1994 236 590-600］はバチルス・サーキュランス（Bacillus circulans）Strain 251由来のCGTaseの三次構造を報告し、Strokopytovら［Strokopytov B, Penninga D, Rozeboom H J；Kalk K H, Dijkhuizen L and Dijkstra B W；Biochemistry 1995 34 2234-2240］は有効なCGTaseインヒビターであるアカルボース（acarbose）と複合体を形成しているバチルス・サーキュランス（Bacillus circulans）Strain 251由来のCGTaseの三次構造を報告し、そしてKnegtelら［Knegtel R M A, Wind R D, Rozeboom H J, Kalk K H, Buitelaar R M, Dijkhuizen L and Dijkstra B W；J. Mol. Biol. 1996 256 611-622］は、サーマス・サーモスルフリゲネス（Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes）由来のCGTaseの三次構造を報告する。
これら及び他の研究は、バチルス・サーキュランスCGTaseが５つのドメインから構造されることを示した。その三次元構造は、CGTaseのＮ末端ドメインがα－アミラーゼのそれに構造的な類似性を有し、他方Ｃ末端ドメインはCGTaseに特有であることが見い出された。
CGTaseの触媒部位はＡドメイン中に位置し、３つの触媒残基を有する（バチルス・サーキュランス株25において、これらは各々Asp229, Glu257及びAsp328である。例えばStrokopytovら、1995、前掲）。中心のアミノ酸残基はＢドメイン中に位置し、その残基周辺にシクロデキストリンが形成され、即ち環化の軸がある。この中心残基の置換、例えばβ－シクロデキストリンに対するγ－シクロデキストリンの相対生産量を増加させるための（CGTase番号で位置195に相当する）バチルス・オーベンシス（Bacilles ohbensis）における残基188におけるチロシンの置換が、Sinら（Sink, Nakamura A, Masaki H, Matsuura Y及びUozumi T；Journal of Biotechnology 1994, 32, 283-288］及びJP－Ａ－5219948により記載される研究の目的であった。
Nakamuraら［Nakamura A, Haga K及びYamane K；Biochemistry 1994, 33, 9929-9936］は、バチルス種株1011 CGTaseの活性中心における４つの残基で行われた置換による基質結合及び環化特性への効果を記載する。これらのCGTaseにおいて、位置183におけるフェニルアラニンはロイシンにより置換され、位置195におけるチロシンは、アラニン、フェニルアラニン、ロイシン、トレオニン、バリン、及びトリプトファンに各々置換され、位置259におけるフェニルアラニンはロイシンにより置換され、そして位置283におけるフェニルアラニンはロイシンにより置換される。
Penningaら［Penninga D, Strokopytov B, Rozeboom H J, Lawson C L, Dijkstra B W, B

ergsma J及びDijkkuizen L；Biochemistry 1995, 34, 3368-3376］は、バチルス・サーキュランス（Bacillus circulans）株251 CGTaseの位置195におけるチロシンにおける部位特異的変異の活性及び生成物選択性への効果を記載する。この出版物において、位置195におけるチロシンが各々フェニルアラニン、トリプトファン、ロイシン及びグリシンにより置換されているCGTase変異体が作られている。

Fujiwaraら［Fujiwara S, Kakihara H, Sakaguchi K及びImanaka T；J. Bacteriol 1992, 174（22）7478-7481］は、（CGTase番号で位置195に相当する）位置181におけるチロシン残基がフェニルアラニンにより置換され、（CGT番号で位置258に相当する）位置254におけるトリプトファン残基がバリンにより置換され、（CGTase番号で位置259に相当する）位置255におけるフェニルアラニンがフェニルアラニン及びイソロイシンに各々置換され、（CGTase番号で位置598に相当する）位置591におけるトレオニン残基がフェニルアラニンにより置換され、そして（CGTase番号で位置636に相当する）位置629におけるトリプトファン残基がフェニルアラニンにより置換されているバチルス・ステアロサーモフィルス由来のCGTase変異体を記載する。

JP－A－7023781は、位置195におけるチロシン残基がロイシン、バリン、フェニルアラニン及びイソロイシンにより各々置換されているバチルス種1011由来のCGTase変異体を記載する。

JP－A－5244945は、（CGTase番号で位置195及び259に相当する）位置222及び286におけるチロシン残基が、β－シクロデキストリンに対するα－シクロデキストリンの相対生産量を増加させるために、フェニルアラニンにより置換されているバチルス・ステアロサーモフィルスTC－91由来のCGTase変異体を記載する。

JP－A－5041985は、領域Aにおける残基140のヒスチジン領域Bにおける残基233のヒスチジン、領域Cにおける残基327のヒスチジン各々をアルギニン及びアスパラギン残基各々により置換されているバチルス種＃1011由来のCGTase変異体を記載する。

EP 630,967は、（CGTase番号で位置195に相当する）バチルス種290－3 CGTaseの位置211におけるチロシン残基、（CGTase番号で位置195に相当する）バチルス種１－１ CGTaseの位置217におけるチロシン残基、及び（CGTase番号で位置195に相当する）バチルス・サーキュランスCGTaseの位置229におけるチロシン残基がトリプトファン及びセリンに置換されているCGTase変異体を記載する。

現在まで、CGTase変異体を作る全ての努力は、活性部位周辺の領域、特にCGTase番号で位置195に相当する中心環化残基の置換を導いている。より遠位の領域において置換を有するCGTaseで示されているものはほんの少ししかなく、これらの変異体の製造はいずれの特定の概念にも基づいていなかった。

発明の概要

本発明の目的は、新規のCGTaseの変異体であって、前駆体酵素と比較した時に、生成物選択性の増加及び／又は生成物阻害の減少を示すことを特徴とする変異体を提供することである。

従って、その第１の態様において、本発明は、前駆体CGTase酵素の基質結合及び／又は生成物選択性を改良する方法であって、該方法が、前記基質に近い位置を保持する前記前駆体酵素の１又は複数のアミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失を含むことを特徴とする方法を提供する。

他の態様において、本発明は、基質に近い位置を保持する１又は複数のアミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失により前駆体CGTase酵素から得られるCGTase変異体を提供する。

第３の態様において、本発明は、本発明のCGTase変異体をコードするDNA構成物を提供する。

第４の態様において、本発明は、本発明のDNA構成物を含む組換え発現ベクターを提供する。

第５の態様において、本発明は、本発明のDNA構成物、又は本発明の組換え発現ベクターを含む宿主細胞を提供する。

第６の態様において、本発明は、本発明のCGTase変異体を生産する方法であって、CGTase

変異体の生産を許容する条件下で本発明の宿主細胞を培養し、そしてその培養物から前記酵素を回収することを含むことを特徴とする方法を提供する。
更なる態様において、本発明は、シクロデキストリンの製造のための過程、直鎖オリゴヌクレオチドの製造のための過程、及びシクロデキストリンのin situ形成のための過程に用いるためのCGTase変異体を提供する。
アミノ酸
本発明の文脈において、以下のアミノ酸及びアミノ酸残基についての記号及び略語を用いる
Ａ＝Ala＝アラニン
Ｃ＝Cys＝システイン
Ｄ＝Asp＝アスパラギン酸
Ｅ＝Glu＝グルタミン酸
Ｆ＝Phe＝フェニルアラニン
Ｇ＝Gly＝グリシン
Ｈ＝His＝ヒスチジン
Ｉ＝Ile＝イソロイシン
Ｋ＝Lys＝リシン
Ｌ＝Leu＝ロイシン
Ｍ＝Met＝メチオニン
Ｎ＝Asn＝アスパラギン
Ｐ＝Pro＝プロリン
Ｑ＝Gln＝グルタミン
Ｒ＝Arg＝アルギニン
Ｓ＝Ser＝セリン
Ｔ＝Thr＝トレオニン
Ｖ＝Val＝バリン
Ｗ＝Trp＝トリプトファン
Ｙ＝Tyr＝チロシン
Ｂ＝Asx＝Asp又はAsn
Ｚ＝Glx＝Glu又はGln
Ｘ＝Xaa＝いずれかのアミノ酸
*＝欠失又は欠損アミノ酸
CGTase変異体
本発明のCGTase変異体は、天然には見い出されないアミノ酸配列を有するCGTase変異体又は突然変異CGTaseである。
本発明のCGTase変異体又は突然変異CGTaseは、前駆体CGTase酵素（即ちネイティブ、親、又は野生型酵素）の機能的誘導体であり、前駆体酵素をコードする前駆体遺伝子又はその誘導体のDNAヌクレオチド配列の変換により得ることができる。CGTase変異体をコードするDNAヌクレオチド配列が適切な宿主生物内の適切なベクター内に挿入された場合にCGTase変異体又は変異CGTaseが発現され、そして生産され得る。宿主生物は前駆体遺伝子の起源である生物と同一である必要はない。
本明細書においては、酵素変異体は、突然変異体又はムテインとしても呼ばれる。
CGTase番号
本発明の文脈において、CGTaseにおけるアミノ酸残基の位置の特定の番号を用いる。種々の周知のCGTaseのアミノ酸配列のアラインメントにより、アミノ酸配列が知られているいずれかのCGTase酵素におけるいずれかのアミノ酸位置に、CGTaseアミノ酸位置番号を明白に割り当てることが可能である。
他の周知のCGTaseの番号とアラインした表１に示されるバチルス・サーキュランス株251から得られたCGTaseのアミノ酸配列の由来の番号システムを用いて、CGTase酵素におけるアミノ酸残基の位置を明らかに示すことが可能である。

本発明に従って作られ又は考慮される種々のCGTase変異体を記載することにおいて、参照の容易さのために以下の命名法が適合される。
〔もとのアミノ酸；位置；置換したアミノ酸〕
従って、位置145におけるセリンのアラニンでの置換は、S145Aと示される。
バチルス・サーキュランス株251からのCGTaseのアミノ酸配列に関連した挿入を示すアミノ酸残基は、先行するCGTase番号にアルファベット順で文字を加えることにより番号をつける。例えば、サーモアナエロバクター種のATCC 53627からのCGTase（表１（ｉ））のアミノ酸の位置91のThrと位置92のGlyとの間の“挿入”Pheについて位置91aFである。
位置149におけるプロリンの欠失はP149*として示され、アミノ酸残基が存在しない位置147と148との間の挿入は、位置147aにおけるアスパラギン酸の挿入について*147aDとして示される。
多重の変異はスラッシュ記号（“／”）により分離され、例えばS145A／P147Lはセリンをアラニンで、そしてアスパラギン酸をロイシンで各々置換した位置145及び147の変異を表す。
置換が、例えばバチルス・サーキュランスの株から得られたCGTaseにおける変異により行われるなら、その生成物は例えば“Ｂ．サーキュランス／S145A”として表される。
CGTase番号による本願において言及される全ての位置は、上述のCGTase番号をいう。

表１

異なるバクテリア源の選択されたCGTaseのアミノ酸配列アラインメント、CGTase番号及びドメイン

ａバチルス・サーキュランス（Bacillus circulans）251；ｂバチルス種（Bacillus sp.）１－１；ｃバチルス種（Bacillus sp.）38－２；ｄバチルス種（Bacillus sp.）1011；ｅバチルス・リケニホルミス（Bacillus licheniformis）；ｆバチルス・マセランス（Bacillus macerans）；ｇバチルス・オーベンシス（Bacillus ohbensis）；ｈバチルス・ステアロサーモフィルス（Bacillus stearothermophilus）；ｉクレブシェラ・ネウモニアエ（Klebsiella pneumoniae）；ｊサーモアナエロバクター（Thermoanaerobacter）ATCC 53627

。

番号	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	ドメイン
1	A	E	A	A	D	S	D	A	E	A	A
2	P	A	P	P	A	P	*	G	P	P	A
3	D	D	D	D	D	D	*	N	E	D	A
4	T	*	T	T	T	T	*	*	E	T	A
5	S	*	S	S	*	S	*	*	T	S	A
6	V	V	V	V	V	V	V	*	Y	V	A
7	S	T	S	S	T	D	T	L	*	S	A
8	N	N	N	N	N	N	N	N	*	N	A
9	K	K	K	K	K	K	K	K	*	V	A
10	Q	V	Q	Q	Q	V	V	V	L	V	A
11	N	N	N	N	N	N	N	N	D	N	A
12	F	Y	F	F	F	F	Y	F	F	Y	A
13	S	S	S	S	S	S	T	T	R	S	A
14	T	D	T	T	T	T	R	S	K	T	A
14a	*	K	*	*	*	*	R	*	K	*	A
15	D	D	D	D	D	D	D	D	E	D	A
16	V	V	V	V	V	V	V	V	T	V	A
17	I	I	I	I	I	I	I	V	I	I	A
18	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	A
19	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	F	Q	A
20	I	I	I	I	V	I	I	I	L	I	A
21	F	V	F	F	F	V	V	V	F	V	A
22	T	T	T	T	T	T	T	V	L	T	A
23	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	A
24	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	A
25	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	A
26	S	S	S	S	L	A	S	V	S	L	A
27	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	A
28	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A
29	N	N	N	N	N	D	D	N	D	N	A

30	P	P	P	P	P	R	P	T	P	P	A
31	A	G	A	A	S	T	S	S	S	S	A
32	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A
33	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A
34	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	A
35	T	S	T	T	T	A	T	S	G	T	A
36	G	G	G	G	G	G	G	G	F	G	A
37	A	A	A	A	A	D	A	A	N	D	A
38	A	I	A	A	A	A	I	L	S	L	A
39	F	F	F	F	F	F	Y	F	A	Y	A
40	D	S	D	D	D	S	S	S	T	D	A
41	G	Q	G	G	G	G	Q	S	Y	P	A
42	T	N	S	S	T	D	D	G	D	T	A
43	C	C	C	C	C	R	C	C	P	H	A
44	T	I	T	T	S	S	S	T	N	T	A
45	N	D	N	N	N	N	D	N	N	S	A
46	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	A
47	R	H	R	R	K	K	H	R	K	K	A
48	L	K	L	L	L	L	K	K	K	K	A
49	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	A
50	C	C	C	C	C	F	C	C	T	F	A
51	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A
52	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A
53	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	A
54	W	W	W	W	W	W	W	W	L	W	A
55	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	R	Q	A
56	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A
57	I	I	I	I	L	I	I	I	L	I	A
58	I	I	I	I	V	I	I	I	I	I	A
59	N	D	N	N	N	D	D	N	N	N	A
60	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	A
61	I	I	I	I	I	I	I	I	L	I	A
62	N	N	N	N	N	N	N	N	*	N	A

63	D	D	D	D	D	D	D	D	*	D	A
64	G	G	G	G	N	G	G	G	P	G	A
65	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	A
66	L	L	L	L	F	L	L	L	L	L	A
67	T	T	T	T	S	T	T	T	K	T	A
68	G	D	G	G	D	G	D	D	S	G	A
69	M	L	M	M	L	M	L	M	L	M	A
70	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A
71	V	I	I	I	V	V	I	V	V	I	A
72	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	A
73	A	A	A	A	A	A	A	A	S	A	A
74	I	L	I	I	L	L	I	I	I	I	A
75	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	A
76	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	A
77	S	S	S	S	S	S	S	S	T	S	A
78	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	P	Q	A
79	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A
80	V	V	V	V	V	V	V	V	I	V	A
81	E	E	E	E	E	E	E	E	D	E	A
82	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A
83	I	V	I	I	I	I	V	V	V	I	A
84	Y	Y	Y	Y	F	T	Y	F	N	Y	A
85	S	A	S	S	A	S	A	S	N	A	A
86	I	*	V	V	T	V	*	V	T	V	A
87	I	L	I	I	I	I	L	M	D	L	A
88	N	H	N	N	N	K	H	N	*	P	A
89	Y	P	Y	Y	Y	Y	P	D	*	D	A
90	S	S	S	S	S	S	S	A	A	S	A
91	G	G	G	G	G	G	G	S	A	T	A
91a	*	Y	*	*	*	*	Y	*	*	F	A
92	V	*	V	V	V	V	*	*	*	G	A
93	N	*	H	N	T	N	*	G	G	G	A
94	N	*	N	N	N	N	*	S	N	S	A

95	T	T	T	T	T	T	T	A	T	T	A
96	A	S	A	A	A	S	S	S	G	S	A
97	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	A
98	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	A
99	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A
100	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	A
101	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	A
102	A	A	A	A	A	A	A	A	G	A	A
103	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	A
104	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	A
105	F	Y	F	F	F	F	Y	F	Y	F	A
106	K	K	K	K	K	K	K	K	F	K	A
107	K	K	K	K	K	Q	R	K	R	K	A
108	T	T	T	T	T	T	T	P	I	T	A
109	N	N	N	N	N	N	N	N	D	N	A
110	P	P	P	P	P	D	P	P	E	P	A
111	A	Y	A	A	Y	A	F	F	H	F	A
112	Y	Y	Y	Y	F	F	Y	F	F	F	A
113	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A
114	T	N	T	T	T	D	D	T	N	S	A
115	I	F	M	M	M	F	F	L	L	F	A
116	A	D	Q	Q	T	A	S	S	D	T	A
117	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	A
118	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	A
119	Q	D	K	K	Q	Q	D	Q	K	Q	A
120	N	R	N	N	N	N	R	R	E	N	A
121	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	A
122	I	M	I	I	V	I	M	V	T	I	A
123	A	S	D	D	T	D	D	D	S	A	A
124	A	T	T	T	T	T	T	A	L	T	A
125	A	A	A	A	A	L	A	A	M	A	A
126	H	H	H	H	H	T	H	H	H	H	A
127	A	S	A	A	A	L	S	A	S	A	A

128	K	N	H	H	K	I	N	K	P	H	A
129	N	G	N	N	G	T	G	G	D	N	A
130	I	I	I	I	I	S	I	I	Y	I	A
131	K	K	K	K	K	R	K	K	N	K	A
132	V	V	V	V	I	S	V	V	M	V	A
133	I	I	I	I	I	D	I	I	K	I	A
134	I	M	I	I	I	R	M	I	L	I	A
135	D	D	D	D	D	L	D	D	V	D	A
136	F	F	F	F	F	R	F	F	L	F	A
137	A	T	A	A	A	P	T	A	D	A	A
138	P	P	P	P	P	Q	P	P	Y	P	A
139	N	N	N	N	N	P	N	N	A	N	A
140	H	H	H	H	H	H	H	H	P	H	A
141	T	S	T	T	T	V	S	T	N	T	A
142	S	S	S	S	S	S	S	S	H	S	A
143	P	P	P	P	P	G	P	P	S	P	A
144	A	A	A	A	A	R	A	A	N	A	B
145	S	L	S	S	M	A	L	S	A	S	B
146	S	E	S	S	E	G	E	E	N	E	B
147	D	T	D	D	T	T	T	T	D	T	B
148	Q	N	D	D	D	N	D	N	E	D	B
149	P	P	P	P	T	P	P	P	N	P	B
150	S	N	S	S	S	G	S	S	E	T	B
151	F	Y	F	F	F	F	Y	Y	F	Y	B
152	A	V	A	A	A	A	A	M	G	G	B
153	E	E	E	E	E	E	E	E	A	E	B
154	N	N	N	N	N	N	N	N	L	N	B
155	G	G	G	G	G	G	G	G	Y	G	B
156	R	A	R	R	K	A	A	R	R	R	B
157	L	I	L	L	L	L	V	L	D	L	B
158	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	G	Y	B
159	D	D	D	D	D	D	N	D	V	D	B
160	N	N	N	N	N	N	D	N	F	N	B

161	G	G	G	G	G	G	G	G	I	G	B
162	T	A	N	N	N	S	V	T	T	V	B
163	L	L	L	L	L	L	L	L	D	L	B
164	L	L	L	L	V	L	I	L	Y	L	B
165	G	G	G	G	G	G	G	G	P	G	B
166	G	N	G	G	G	A	N	G	T	G	B
167	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	B
168	T	S	T	T	T	S	S	T	V	T	B
169	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	B
170	D	D	D	D	D	D	D	D	A	D	B
171	T	Q	T	T	T	T	P	A	N	T	B
172	Q	Q	Q	Q	N	A	N	N	T	N	B
173	N	N	N	N	G	G	N	M	G	G	B
174	L	L	L	L	Y	L	L	Y	W	Y	B
175	F	F	F	F	F	F	F	F	Y	F	B
176	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B
177	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B
178	N	N	Y	Y	N	N	N	N	N	Y	B
179	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	B
180	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	B
181	T	T	T	T	S	T	T	T	V	T	B
182	D	D	D	D	D	D	D	T	T	N	B
182a	*	*	*	*	*	*	*	*	N	*	B
183	F	F	F	F	F	F	F	F	W	F	B
184	S	S	S	S	S	S	S	S	N	S	B
185	T	S	T	T	T	T	S	S	D	S	B
186	T	Y	I	I	L	I	Y	L	F	Y	B
187	E	E	E	E	E	E	E	E	F	E	B
188	N	D	N	N	N	D	D	D	Q	D	B
189	G	S	G	G	G	G	S	G	V	G	B
190	I	I	I	I	I	I	I	I	K	I	B
191	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	B
192	K	R	K	K	K	K	R	R	H	R	B

193	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	B
194	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	B
195	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	F	F	F	B
196	D	D	D	D	D	D	D	D	N	D	B
197	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	B
198	A	A	A	A	A	A	A	A	S	A	B
199	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	B
200	L	Y	L	L	L	I	Y	L	L	L	B
201	N	D	N	N	N	N	D	N	N	D	B
202	H	L	H	H	H	H	L	H	Q	Q	B
203	N	N	N	N	N	N	N	Q	S	Q	B
204	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	B
205	S	T	S	S	S	N	T	P	T	S	A
206	T	V	S	S	T	A	V	V	D	T	A
207	V	M	V	V	I	M	M	I	V	I	A
208	D	D	D	D	D	D	D	D	Y	D	A
209	V	Q	V	V	T	A	Q	R	Q	S	A
210	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	A
211	L	L	L	L	F	F	L	L	L	L	A
212	K	K	K	K	K	K	K	K	L	K	A
213	D	E	D	D	D	S	E	D	D	A	A
214	A	S	A	A	A	A	S	A	G	A	A
215	I	I	I	I	I	I	I	V	S	I	A
216	K	K	K	K	K	D	K	K	K	K	A
217	M	F	M	M	L	L	L	M	F	L	A
218	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	A
219	L	L	L	L	L	L	L	I	I	L	A
220	D	D	D	D	D	G	D	D	D	D	A
221	L	K	L	L	M	M	K	M	A	M	A
222	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A
223	I	I	V	V	V	V	I	I	V	I	A
224	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	A
225	G	G	G	G	G	G	G	G	A	G	A

226	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	A
227	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	A
228	M	V	V	V	V	F	V	M	I	M	A
229	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	A
230	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
231	V	V	V	V	V	V	V	V	I	V	A
232	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	A
233	H	H	H	H	H	Q	H	H	H	H	A
234	M	M	M	M	M	Y	M	M	M	M	A
235	P	S	P	P	P	P	S	P	D	A	A
236	F	E	F	F	Q	F	E	F	K	F	A
237	G	G	G	G	G	G	G	G	S	G	A
238	W	W	W	W	W	W	W	W	F	W	A
239	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	I	Q	A
240	K	T	K	K	K	K	T	K	Q	K	A
241	S	S	S	S	N	S	S	S	K	N	A
242	F	L	F	F	W	F	L	L	W	F	A
243	M	M	M	M	M	V	M	M	T	M	A
244	A	S	S	A	S	S	S	D	S	D	A
245	A	E	T	T	S	S	D	E	D	S	A
246	V	I	I	I	I	I	I	I	I	I	A
247	N	Y	N	N	Y	Y	Y	D	Y	L	A
248	N	S	N	N	A	G	A	N	D	S	A
249	Y	H	Y	Y	H	G	H	Y	Y	Y	A
249a	*	*	*	*	*	D	*	*	S	*	A
250	K	K	K	K	K	H	E	R	K	R	A
251	P	P	P	P	P	P	P	P	S	P	A
252	V	V	V	V	V	V	V	V	I	V	A
253	F	F	F	F	F	F	F	F	G	F	A
254	T	T	N	T	T	T	T	T	R	T	A
255	F	F	F	F	F	F	F	F	E	F	A
256	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A
257	E	E	E	E	E	E	E	E	F	E	A

258	W	W	W	W	W	W	W	W	F	W	A
259	F	F	F	F	F	Y	F	F	F	Y	A
260	L	L	L	L	L	L	L	L	F	L	A
261	G	G	G	G	G	G	G	S	G	G	A
262	V	S	V	V	S	A	S	E	E	T	A
263	N	G	N	N	A	D	G	N	W	N	A
264	E	E	E	E	A	Q	E	E	F	E	A
265	V	V	I	I	P	T	V	V	G	V	A
266	S	D	S	S	D	D	D	D	A	D	A
267	P	P	P	P	A	G	P	A	S	P	A
268	E	Q	E	E	D	D	Q	N	A	N	A
269	N	N	Y	Y	N	N	N	N	N	N	A
270	H	H	H	H	T	I	H	H	T	T	A
271	K	H	Q	Q	D	K	H	Y	T	Y	A
272	F	F	F	F	F	F	F	F	T	F	A
273	A	A	A	A	A	A	A	A	G	A	A
274	N	N	N	N	N	N	N	N	V	N	A
275	E	E	E	E	E	E	E	E	D	E	A
276	S	S	S	S	S	S	S	S	G	S	A
277	G	G	G	G	G	G	G	G	N	G	A
278	M	M	M	M	M	M	M	M	A	M	A
279	S	N	S	S	S	N	S	S	I	S	A
280	L	L	L	L	L	L	L	L	D	L	A
281	L	L	L	L	L	L	L	L	Y	L	A
282	D	D	D	D	D	D	D	D	A	D	A
283	F	F	F	F	F	F	F	F	N	F	A
284	R	Q	P	R	R	E	Q	R	T	R	A
285	F	F	F	F	F	Y	F	F	S	F	A
286	A	G	A	A	N	A	G	G	G	A	A
287	Q	Q	Q	Q	S	Q	Q	Q	S	Q	A
288	K	T	K	K	A	E	T	K	A	K	A
289	V	I	A	A	V	V	I	L	L	V	A
290	R	R	R	R	R	R	R	R	L	R	A

291	Q	N	Q	Q	N	E	D	Q	D	Q	A
292	V	V	V	V	V	V	V	V	F	V	A
293	F	L	F	F	F	F	L	L	G	F	A
294	R	K	R	R	R	R	M	R	F	R	A
295	D	D	D	D	D	D	D	N	R	D	A
296	N	R	N	N	N	K	G	N	D	N	A
297	T	T	T	T	T	T	S	S	T	T	A
298	D	S	D	D	S	E	S	D	L	D	A
299	N	N	N	N	N	T	N	N	E	T	A
300	M	W	M	M	M	M	W	W	R	M	A
301	Y	Y	Y	Y	Y	K	Y	Y	V	Y	A
302	G	D	G	G	A	D	D	G	L	G	A
303	L	F	L	L	L	L	F	F	V	L	A
304	K	N	K	K	D	Y	N	N	G	D	A
305	A	E	A	A	S	E	E	Q	R	S	A
306	M	M	M	M	M	V	M	M	S	M	A
307	L	I	L	L	L	L	I	I	G	I	A
308	E	T	E	E	T	A	A	Q	N	Q	A
309	G	S	G	G	A	S	S	D	T	S	A
310	S	T	S	S	T	T	T	T	M	T	A
311	A	E	E	E	A	E	E	A	K	A	A
312	A	K	V	V	A	S	E	S	T	A	A
313	D	E	D	D	D	Q	D	A	L	D	A
314	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	A
315	A	N	A	A	N	D	D	D	S	N	A
316	Q	E	Q	Q	Q	Y	E	E	Y	F	A
317	V	V	V	V	V	I	V	V	L	I	A
318	D	I	N	N	N	N	I	L	I	N	A
319	D	D	D	D	D	N	D	D	K	D	A
320	Q	Q	Q	Q	Q	M	Q	Q	R	M	A
321	V	V	V	V	V	V	V	V	Q	V	A
322	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	A
323	F	F	F	F	F	F	F	F	V	F	A

324	I	I	I	I	I	I	I	I	F	I	A
325	D	D	D	D	D	D	D	D	T	D	A
326	N	N	N	N	N	N	N	N	S	N	A
327	H	H	H	H	H	H	H	H	D	H	A
328	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	A
329	M	M	M	M	M	M	M	M	W	M	A
330	E	S	E	E	D	D	S	D	Q	D	A
331	R	R	R	R	R	R	R	R	V	R	A
332	F	F	F	F	F	F	F	F	V	F	A
333	H	S	H	H	K	Q	S	M	F	Y	A
334	A	V	T	T	T	V	F	I	M	T	A
335	S	G	S	S	S	A	E	D	D	G	A
336	N	S	N	N	A	G	Q	G	N	*	A
337	A	S	G	G	V	S	S	G	H	G	A
338	N	S	D	D	N	G	S	D	D	S	A
339	R	N	R	R	N	T	N	P	M	T	A
340	R	R	R	R	R	R	R	R	A	R	A
341	K	Q	K	K	R	A	H	K	R	P	A
342	L	T	L	L	L	T	T	V	I	V	A
343	E	D	E	E	E	E	D	D	G	E	A
344	Q	M	Q	Q	Q	Q	I	M	T	Q	A
345	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
346	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	A
347	A	A	A	A	A	A	A	A	R	A	A
348	F	V	F	F	F	L	V	V	S	F	A
349	T	L	T	T	T	T	L	L	N	T	A
350	L	L	L	L	L	L	L	L	A	L	A
351	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	A
352	S	S	S	S	S	S	S	S	T	S	A
353	R	R	R	R	R	R	R	R	F	R	A
354	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A
355	V	V	V	V	V	V	V	V	P	V	A
356	P	P	P	P	P	P	P	P	G	P	A

357	A	T	A	A	A	A	T	N	N	A	A
358	I	I	I	I	I	I	I	I	N	I	A
359	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	E	Y	A
360	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	T	Y	A
361	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A
362	T	T	S	S	T	T	T	T	G	T	A
363	E	E	E	E	E	E	E	E	S	E	A
364	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	A
365	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	S	Y	A
366	M	V	M	M	L	M	L	M	E	M	A
367	S	T	S	S	T	T	T	T	A	T	A
368	G	G	G	G	G	G	G	G	F	G	A
369	G	G	G	G	N	D	G	N	A	N	A
370	T	N	N	N	G	G	N	G	Q	G	A
371	D	D	D	D	D	D	D	D	K	D	A
372	P	P	P	P	P	P	P	P	R	P	A
373	D	E	D	D	D	N	E	N	I	Y	A
374	N	N	N	N	N	N	N	N	D	N	A
375	R	R	R	R	R	R	R	R	L	R	A
376	A	K	A	A	G	A	K	K	G	A	A
377	R	P	R	R	K	M	P	M	L	M	A
378	I	L	I	L	M	M	M	M	V	M	A
379	P	K	P	P	P	T	S	S	A	T	A
380	S	T	S	S	S	S	D	S	T	S	A
381	F	F	F	F	F	F	F	F	M	F	A
382	S	D	S	S	S	N	D	N	T	D	A
383	T	R	T	T	K	T	R	K	V	T	A
384	S	S	T	T	S	G	T	N	R	T	A
385	T	T	T	T	T	T	T	T	G	T	A
386	T	N	T	T	T	T	N	R	I	T	A
387	A	S	A	A	A	A	S	A	P	A	A
388	Y	Y	Y	Y	F	Y	Y	Y	A	Y	A
389	Q	Q	Q	Q	N	K	Q	Q	I	N	A

390	V	I	V	V	V	V	I	V	Y	V	A
391	I	I	I	I	I	I	I	I	Y	I	A
392	Q	S	Q	Q	S	Q	S	Q	G	K	A
393	K	K	K	K	K	A	T	K	T	K	A
394	L	L	L	L	L	L	L	L	E	L	A
395	A	A	A	A	A	A	A	S	H	A	A
396	P	S	P	P	P	P	S	S	Y	P	A
397	L	L	L	L	L	L	L	L	A	L	A
398	R	R	R	R	R	R	R	R	A	R	A
399	K	Q	K	K	K	K	Q	R	N	K	A
400	C	T	S	S	S	S	N	N	F	S	A
401	N	N	N	N	N	N	N	N	T	N	A
402	P	S	P	P	P	P	P	P	S	P	A
403	A	A	A	A	A	A	A	A	N	A	A
404	I	L	I	I	I	I	L	L	S	I	A
405	A	G	A	A	A	A	G	A	F	A	A
406	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	G	Y	A
407	G	G	G	G	G	G	G	G	Q	G	C
408	S	T	S	S	S	T	N	D	V	T	C
409	T	T	T	T	T	T	T	T	G	Q	C
410	Q	T	Q	H	Q	T	S	E	S	K	C
411	E	E	E	E	Q	E	E	Q	D	Q	C
412	R	R	R	R	R	R	R	R	P	R	C
413	W	W	W	W	W	W	W	W	Y	W	C
414	I	L	I	I	I	V	I	I	N	I	C
415	N	N	N	N	N	N	N	N	R	N	C
416	N	E	N	N	N	N	S	G	E	N	C
417	D	D	D	D	D	D	D	D	K	D	C
418	V	I	V	V	V	V	V	V	M	V	C
419	L	Y	I	I	Y	L	Y	Y	P	Y	C
420	I	I	I	I	I	I	I	V	G	I	C
421	Y	Y	Y	Y	Y	I	Y	Y	F	Y	C
422	E	E	E	E	E	E	E	E	D	E	C

423	R	R	R	R	R	R	R	R	T	R	C
424	K	T	K	K	K	K	S	Q	E	Q	C
425	F	F	F	F	F	F	F	F	S	F	C
426	G	G	G	G	G	G	G	G	E	G	C
427	S	N	N	N	K	S	D	K	A	N	C
428	N	S	N	N	S	S	S	D	F	N	C
429	V	I	V	V	V	A	V	V	S	V	C
430	A	V	A	A	A	A	V	V	I	A	C
431	V	L	V	V	V	L	L	L	I	L	C
432	V	T	V	V	V	V	T	V	K	V	C
433	A	A	A	A	A	A	A	R	T	A	C
434	V	V	I	I	V	I	V	V	L	I	C
435	N	N	N	N	N	N	N	N	G	N	C
436	R	S	R	R	R	R	S	R	D	R	C
437	N	*	N	N	N	N	*	S	L	N	C
438	L	S	M	M	L	S	G	S	R	L	C
439	N	N	N	N	T	S	D	S	K	S	C
440	A	S	T	T	T	A	T	S	S	T	C
441	P	N	P	P	P	A	S	N	S	S	C
442	A	Q	A	A	T	Y	Y	Y	P	Y	C
443	S	T	S	S	S	P	T	S	A	Y	C
444	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	C
445	S	T	T	T	T	S	N	T	Q	T	C
446	G	N	G	G	N	G	N	G	N	G	C
447	L	L	L	L	L	L	L	L	G	L	C
448	V	N	V	V	N	L	N	F	T	Y	C
449	T	T	T	T	T	S	T	T	Y	T	C
450	S	S	S	S	S	S	S	A	T	A	C
451	L	L	L	L	L	L	L	L	E	L	C
452	P	P	P	R	P	P	P	P	L	P	C
453	Q	Q	Q	R	S	A	Q	A	W	A	C
454	G	G	G	A	G	G	G	G	V	G	C
455	S	N	S	S	T	T	Q	T	N	T	C

456	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	D	Y	C
457	N	T	N	N	T	S	T	T	D	S	C
458	D	D	D	D	D	D	D	D	I	D	C
459	V	E	V	V	V	V	E	Q	L	M	C
460	L	L	L	L	L	L	L	L	V	L	C
461	G	Q	G	G	G	N	Q	G	F	G	C
462	G	Q	G	G	G	G	Q	G	E	G	C
463	L	R	I	I	V	L	L	L	R	L	C
464	L	L	L	L	L	L	L	L	R	L	C
465	N	D	N	N	N	N	D	D	S	N	C
466	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	C
467	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	C
468	T	T	T	T	N	S	E	T	D	S	C
469	L	I	L	L	I	I	I	I	I	I	C
470	S	T	T	T	T	T	T	Q	V	T	C
471	V	V	V	V	S	V	V	V	I	V	C
472	G	N	G	G	S	G	N	G	V	S	C
473	S	A	A	A	G	S	S	S	A	S	C
474	G	N	G	G	G	G	N	N	L	N	C
475	G	G	G	G	N	G	G	G	N	G	C
476	A	A	A	A	I	A	A	S	R	S	C
477	A	V	A	A	*	V	V	V	G	V	C
478	S	N	S	S	S	T	D	N	E	T	C
479	N	S	N	N	S	N	S	A	A	P	C
480	F	F	F	F	F	F	F	F	N	F	C
481	T	Q	T	T	T	T	Q	D	T	T	C
482	L	L	L	L	L	L	L	L	I	L	C
483	A	R	A	A	A	A	S	G	N	A	C
484	A	A	P	P	A	A	A	P	V	P	C
485	G	N	G	G	G	G	N	G	K	G	C
486	G	S	G	G	A	G	G	E	N	E	C
487	T	V	T	T	T	T	V	V	I	V	C
488	A	A	A	A	A	A	S	G	A	A	C

489	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	C
490	W	W	W	W	W	W	W	W	P	W	C
491	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	A	N	Q	C
492	Y	V	Y	Y	Y	Y	I	Y	G	Y	C
493	T	S	T	T	T	T	T	S	V	V	C
494	A	N	T	T	A	A	E	A	Y	S	C
495	A	P	D	D	S	P	E	T	P	T	C
496	T	S	A	A	E	E	H	E	S	T	D
497	A	T	T	T	T	T	A	S	L	N	D
498	T	S	A	T	T	S	S	T	I	P	D
499	P	P	P	P	P	P	P	P	G	P	D
500	T	L	I	I	T	A	L	I	N	L	D
501	I	I	N	I	I	I	I	I	N	I	D
502	G	G	G	G	G	G	G	G	S	G	D
503	H	Q	N	N	H	N	H	H	V	H	D
504	V	V	V	V	V	V	V	V	S	V	D
505	G	G	G	G	G	G	G	G	V	G	D
506	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	D
507	M	M	M	M	V	T	M	M	N	T	D
508	M	M	M	M	M	M	M	M	K	M	D
509	A	G	A	A	G	G	G	G	R	T	D
510	K	K	K	K	K	Q	K	Q	T	K	D
511	P	A	A	P	P	P	H	V	T	A	D
512	G	G	G	G	G	G	G	G	L	G	D
513	V	N	V	V	N	N	N	H	T	Q	D
514	T	T	T	T	V	I	T	Q	L	T	D
515	I	I	I	I	V	V	V	V	M	I	D
516	T	T	T	T	T	T	T	T	Q	T	D
517	I	V	I	I	I	I	I	I	N	I	D
518	D	S	D	D	D	D	T	D	E	D	D
519	G	G	G	G	G	G	G	G	A	G	D
520	R	E	R	R	R	R	E	E	V	R	D
521	G	G	A	G	G	G	G	G	V	G	D

522	F	F	*	F	F	F	F	F	I	F	D
523	G	G	S	G	G	G	G	G	R	G	D
524	S	D	A	S	S	G	D	T	S	T	D
525	S	E	R	G	A	T	N	N	Q	T	D
526	K	R	Q	K	K	A	E	T	S	A	D
527	G	G	G	G	G	G	G	G	D	G	D
528	T	S	T	T	T	T	S	T	D	Q	D
529	V	V	V	V	V	V	V	V	A	V	D
530	Y	L	Y	Y	Y	Y	L	K	E	L	D
531	F	F	F	F	F	F	F	F	N	F	D
532	G	D	G	G	G	G	D	G	P	G	D
533	T	S	T	T	T	T	S	T	T	T	D
534	T	T	T	T	T	T	D	T	V	T	D
535	A	S	A	A	A	A	F	A	Q	P	D
536	V	S	V	V	V	V	S	A	S	A	D
537	S	E	T	T	T	T	D	N	I	T	D
538	G	*	G	G	G	G	*	*	N	*	D
539	A	*	A	A	S	S	*	*	F	*	D
540	D	*	D	D	A	G	*	*	T	*	D
541	I	I	I	I	I	I	V	V	C	I	D
542	T	I	V	V	T	V	L	V	N	V	D
543	S	S	A	A	S	S	S	S	N	S	D
544	W	W	W	W	W	W	W	W	G	W	D
545	E	S	E	E	E	E	S	S	Y	E	D
546	D	N	D	D	D	D	D	N	T	D	D
547	T	T	T	T	T	T	T	N	I	T	D
548	Q	K	Q	Q	Q	Q	K	Q	S	E	D
549	I	I	I	I	I	I	I	I	G	V	D
550	K	S	Q	Q	K	K	E	V	Q	K	D
551	V	V	V	V	V	A	V	V	S	V	D
552	K	K	K	K	T	V	S	A	V	K	D
553	I	V	I	I	I	I	V	V	Y	V	D
554	P	P	L	P	P	P	P	P	I	P	D

555	A	N	R	A	P	K	D	N	I	A	D
556	V	V	V	V	V	V	V	V	G	L	D
557	A	A	P	P	A	A	T	S	N	T	D
558	G	G	G	G	G	A	A	P	I	P	D
559	G	G	G	G	G	G	G	G	P	G	D
560	N	Y	I	I	D	K	H	K	Q	K	D
561	Y	Y	Y	Y	Y	T	Y	Y	L	Y	D
562	N	D	D	D	A	G	D	N	G	N	D
563	I	L	I	I	V	V	I	I	G	I	D
564	K	S	R	R	K	S	S	T	W	T	D
565	V	V	V	V	V	V	V	V	D	L	D
566	A	V	A	A	A	K	V	Q	L	K	D
567	N	T	N	N	A	T	N	S	T	T	D
568	A	A	A	A	*	S	A	S	K	A	D
569	A	A	A	A	N	S	G	S	A	S	D
570	G	N	G	G	G	G	D	G	V	G	D
571	T	I	A	A	V	T	S	Q	K	V	D
572	A	K	A	A	N	A	Q	T	I	T	D
573	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	D
574	N	P	N	N	N	N	P	A	P	N	D
575	V	T	I	I	A	T	T	A	T	S	D
576	Y	Y	Y	Y	Y	F	Y	Y	Q	Y	D
577	D	K	D	D	N	K	D	D	Y	N	D
578	N	E	N	N	D	S	K	N	P	N	D
579	F	F	F	F	F	F	F	F	Q	I	D
580	E	E	E	E	T	N	E	E	W	N	D
581	V	V	V	V	I	V	V	V	S	V	D
582	L	L	L	L	L	L	L	L	A	L	D
583	S	S	T	T	S	T	T	T	S	T	D
584	G	G	G	G	G	G	G	N	L	G	E
585	D	N	D	D	D	D	D	D	E	N	E
586	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	L	Q	E
587	V	V	V	V	V	V	V	V	P	V	E

588	S	S	T	T	S	T	S	S	S	C	E
589	V	V	V	V	V	V	I	V	D	V	E
590	R	R	R	R	R	R	R	R	L	R	E
591	F	F	F	F	F	F	F	F	N	F	E
592	V	G	V	V	V	L	A	V	V	V	E
593	V	V	I	I	I	V	V	V	E	V	E
594	N	N	N	N	N	N	N	N	W	N	E
595	N	N	N	N	N	Q	N	N	K	N	E
596	A	A	A	A	A	A	A	A	C	A	E
597	T	T	T	T	T	N	T	T	V	T	E
598	T	T	T	T	T	T	T	T	K	T	E
599	A	S	A	A	A	N	S	N	R	V	E
600	L	P	L	L	L	Y	L	L	N	W	E
601	G	G	G	G	G	G	G	G	E	G	E
602	Q	T	Q	Q	E	T	T	Q	T	E	E
603	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	E
604	V	L	V	V	I	V	L	I	P	V	E
605	Y	Y	F	F	Y	Y	Y	Y	T	Y	E
606	L	I	L	L	L	L	M	I	A	L	E
607	T	V	T	T	T	V	V	V	N	T	E
608	G	G	G	G	G	G	G	G	V	G	E
609	S	N	N	N	N	N	N	N	E	N	E
610	V	V	V	V	V	A	V	V	W	V	E
611	S	N	S	S	S	A	N	Y	Q	A	E
612	E	E	E	E	E	E	E	E	S	E	E
613	L	L	L	L	L	L	L	L	G	L	E
614	G	G	G	G	G	G	G	G	A	G	E
615	N	N	N	N	N	T	N	N	N	N	E
616	W	W	W	W	W	W	W	W	N	W	E
617	D	D	D	D	T	D	D	D	Q	D	E
618	P	A	P	P	T	P	P	T	F	T	E
619	A	D	N	N	G	N	D	S	N	S	E
620	K	K	N	N	A	K	Q	K	S	K	E

621	A	A	A	A	A	A	A	A	N	A	E
621a	*	*	*	*	S	*	*	*	*	*	E
622	I	I	I	I	I	I	I	I	D	I	E
623	G	G	G	G	G	G	G	G	T	G	E
624	P	P	P	P	P	P	P	P	Q	P	E
625	M	M	M	M	A	M	M	M	T	M	E
626	Y	F	Y	Y	F	Y	F	F	T	F	E
627	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	E
628	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	G	Q	E
629	V	V	V	V	V	V	V	V	S	V	E
630	V	M	V	V	I	I	M	V	F	V	E
631	Y	Y	Y	Y	H	A	Y	Y	F	Y	E
632	Q	Q	Q	Q	A	K	Q	S		Q	E
633	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	E
634	P	P	P	P	P	P	P	P		P	E
635	N	T	T	T	T	S	T	T		T	E
636	W	W	W	W	W	W	W	W		W	E
637	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	E
638	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	I		Y	E
639	D	D	D	D	D	D	D	D		D	E
640	V	I	V	V	V	V	I	V		V	E
641	S	S	S	S	S	S	S	S		S	E
642	V	V	V	V	V	V	V	V		V	E
643	P	P	P	P	P	P	P	P		P	E
644	A	A	A	A	A	A	A	E		A	E
645	G	G	G	G	G	G	E	G		G	E
646	K	K	Q	Q	K	T	E	K		T	E
647	T	N	T	T	Q	K	N	T		T	E
648	I	L	I	I	L	L	L	I		I	E
649	E	E	E	E	E	D	E	E		E	E
650	F	Y	F	F	F	F	Y	F		F	E
651	K	K	K	K	K	K	K	K		K	E
652	F	Y	F	F	F	F	F	F		F	E

653	L	I	L	L	F	I	I	I	I	E
654	K	K	K	K	K	K	K	K	K	E
655	K	K	K	K	K	K	K	K	K	E
656	Q	D	Q	Q	N	G	D	D	N	E
657	G	Q	G	G	G	G	S	S	G	E
658	S	N	S	S	A	G	S	Q	S	E
658a	*	G	*	*	*	*	G	G	*	E
659	T	N	T	T	T	T	N	N	T	E
660	V	V	V	V	I	V	V	V	V	E
661	T	V	T	T	T	T	V	T	T	E
662	W	W	W	W	W	W	W	W	W	E
663	E	Q	E	E	E	E	E	E	E	E
664	G	S	G	G	G	G	S	S	G	E
665	G	G	G	G	G	G	G	G	G	E
666	S	N	A	A	S	G	N	S	Y	E
667	N	N	N	N	N	N	N	N	N	E
668	H	R	R	R	H	H	H	H	H	E
669	T	T	T	T	T	T	T	V	V	E
670	F	Y	F	F	F	Y	Y	Y	Y	E
671	T	T	T	T	T	T	T	T	T	E
672	A	S	T	T	T	T	T	T	T	E
673	P	P	P	P	P	P	P	P	P	E
674	S	T	T	T	T	A	A	T	T	E
675	S	T	S	S	S	S	T	N	S	E
676	G	G	G	G	G	G	G	T	G	E
677	T	T	T	T	T	V	T	T	T	E
678	A	D	A	A	A	G	D	G	A	E
679	T	T	T	T	T	T	T	K	T	E
680	I	V	V	V	V	V	V	I	V	E
681	N	M	N	N	T	T	L	I	I	E
682	V	I	V	V	I	V	V	V	V	E
683	N	N	N	N	N	D	D	D	D	E
684	W	W	W	W	W	W	W	W	W	E

685	Q		Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	E
686	P		P	P		N		N	P	E

* この位置で欠損したアミノ酸残基

図面の簡単な記載

本発明は、添付の図面を参照することにより更に詳説される。

図１は、直鎖デンプン分子と複合体化されているバチルス・サーキュランス株251からのCGTaseの活性部位クレフト（ドメインＡ及びＢ）、及びその酵素－基質相互作用に関連する残基の構造のモデルを示す。

図２は、（Ａ）野生型酵素（バチルス・サーキュランス株251 CGTase）、（Ｂ）Y89D CGTase変異体、（Ｃ）S146P CGTase変異体、及び（Ｄ）Y89D／S146P CGTase変異体により触媒された50℃における50時間のインキュベーションの間の10％ Paselli™ WA4（プレゼラチン化ドラム－乾燥デンプン）からのα－（●），β－（■）、及びγ－（▲）シクロデキストリンの形成（シクロデキストリン（％））を示す。

図３は、プラスミドpDP66Kの構造を示し、ここでサブクローニングステップは矢印近くに示される。

図４は、β－シクロデキストリンなし（●）、及び0.1mM　β－シクロデキストリン（○）での０～８％の生のデンプンのデンプン濃度におけるデンプン結合実験（生のデンプンに結合したタンパク質の割合（％））の結果を示す；（ａ）野生型（バチルス・サーキュランス株251 CGTase）、（ｂ）W616A／W662A変異体、及び（ｃ）Y633A変異体。

図５は、β－シクロデキストリンなし（●）、0.1mM　β－シクロデキストリン（○）、及び0.2mM　β－シクロデキストリン（◆）での０～５％のPaselli™の濃度におけるPaselli™ SA2（即ち部分的に加水分解されたポテトデンプン）での反応速度実験（活性，U／mg）の結果を示す；（ａ）野生型酵素（バチルス・サーキュランス株251 CGTase）、（ｂ）W616A／W662A変異体、及び（ｃ）Y633A変異体。

図６は、野生型酵素（バチルス・サーキュランス株251 CGTase）（●）、W616A／W626A変異体（□）、及びY633A変異体（■）での０～60％の生のデンプンのデンプン濃度における生のデンプンでの反応速度実験の結果（活性、U／mg）を示す；点線は、Ｅドメイン上のMBS２とＣドメイン上のMBS３との間に支持された相互作用からのモデルの曲線を示す。

図７は、０～45時間のインキュベーションの間の野生型酵素（バチルス・サーキュランス株251、図７Ａ）と比較した本発明の２つのCGTase変異体（N193G、図７Ｂ、及びY89G、図７Ｃ）の生成物形成（○：α－シクロデキストリン形；□：β－シクロデキストリン形成、及び△：γ－シクロデキストリン形成）を示す。

図８は、０～45時間のインキュベーションの間の野生型酵素（バチルス・サーキュランス株251、図８Ａ）と比較した本発明の２つのCGTase変異体（*145aI、図８Ｂ、及びD371G、図８Ｃ）の生成物形成（○：α－シクロデキストリン形成；□：β－シクロデキストリン形成；及び△：γ－シクロデキストリン形成）を示す。

図９は、０～10時間のインキュベーションの間の野生型酵素（バチルス・サーキュランス株251、図９Ａ）と比較した本発明の２つのCGTase変異体（N193G、図９Ｂ、及びY89G、図９Ｃ）の生成物形成（○：α－シクロデキストリン形成；□：β－シクロデキストリン形成；及び△：γ－シクロデキストリン形成）を示す。

図10は、０～10時間のインキュベーションの間の野生型酵素（バチルス・サーキュランス株251、図10Ａ）と比較した本発明の２つのCGTase変異体（145aI、図10Ｂ、及びD371G、図10Ｃ）の生成物形成（○：α－シクロデキストリン形成；□：β－シクロデキストリン形成；及び△：γ－シクロデキストリン形成）を示す。

発明の詳細な記載

その第１の態様において、本発明は、基質結合を改良し及び／又はCGTase酵素の生成物選

択性を増力させることにより、前駆体酵素と比較して、改良された基質結合能及び／又は増加された生成物選択性を有するCGTase変異体を得る方法を提供する。
本発明の文脈において、改良された基質結合能力のCGTase変異体は、その基質により有効に作用することができるCGTase変異体、及び／又は生成物阻害によりより影響を受けないCGTase変異体を記述することを意味する。本発明の文脈において、生成物阻害とは、生成物の増加量が減少し又は基質転化を阻害さえする現象を記述することを意味する。生成物阻害によりより影響を受けないCGTase変異体（即ち生成物阻害の減少した変異体）を得ることが要求される。
更に、本発明の文脈において、生成物選択性の増加したCGTase変異体とは、前駆体酵素と比較して、種々のシクロデキストリンのいずれかをより選択的に生産することができ、それにより要求される生成物の比率を増加させるCGTase変異体を記述することを意味する。
本発明は活性部位クレフト、基質結合クレフト、又はそれらを導く溝のサブ部位中に“障害物”を除去及び／又は導入し、それにより予め決められた大きさの生成物を得るように、及び基質結合がその生成物によって阻害されないようにその基質の導入及びその配置を容易にする概念に基づく。
CGTaseの基質結合を改良することにより、その生成物選択性は、CGTase変異体が種々のシクロデキストリン、即ちα－，β－及びγ－シクロデキストリンのいずれかをより選択的に生産することができるように改良され得る。９，10及び11グルコース単位を各々有するδ，ε－、及びζ－シクロデキストリンを生産することができるCGTaseでさえ得ることができる。CGTaseの基質結合の改良は、生成物阻害の傾向も減少させることができ、それによりCGTase変異体のシクロデキストリン収率を増加させることができる。
本発明の概念は、酵素－基質側鎖分子内相互作用の改良として異なって表現され得る。本発明に従って特定の変異を導入することにより、基質とCGTaseとの間の分子内相互作用は、活性部位クレフト中の特定の位置に基質を方向づけるように変化させることができ、それにより予め決められた大きさの環式もしくは直鎖生成物、好ましくはα－，β－もしくはγ－シクロデキストリン、もしくはδ，ε－、及びζ－シクロデキストリン、又は同様の大きさの直鎖オリゴサッカリド、好ましくは２～12グルコース単位のもの、より好ましくは２～９グルコース単位のものを得ることができる。
本発明の好ましい実施形態において、図１のグルコース単位Ｃ～Ｉ、好ましくはＣ～Ｈ周囲の領域におけるより多くの分子内相互作用（例えばより多くの水素結合ポテンシャル）の導入は、（図１のグルコース単位ＢとＣとの間の）触媒部位から６グルコース単位の位置で基質を閉じ込め、α－シクロデキストリン（６－グルコース単位）についての生成物選択性を増加させるであろう。更に、より大きいシクロデキストリン及び／又はより大きいオリゴサッカリドの形成は、図１のグルコース単位Ｉ～Ｊの潜在的分子内相互作用を減少させることにより、同時に削減され得る。
本発明の他の好ましい実施形態において、図１のグルコース単位Ｆ～Ｊ、好ましくはＨ及びＩ周囲の領域におけるより多くの分子内相互作用（例えばより多くの水素結合ポテンシャル）の導入は、（図１のグルコース単位ＢとＣとの間の）触媒部位から７グルコース単位の位置で基質を閉じ込め、β－シクロデキストリン（７－グルコース単位）についての生成物選択性を増加させるであろう。更に、例えばα－シクロデキストリン及び／又は小さな直鎖オリゴサッカリドの形成は、図１のグルコース単位Ｃ～Ｇの潜在的分子内相互作用を減少させることにより、同時に削減され得る。
本発明の第３の好ましい実施形態において、図１のグルコース単位Ｉ～Ｋ、好ましくはＩ及びＪ周囲の領域におけるより多くの分子内相互作用（例えばより多くの水素結合ポテンシャル）の導入は、（図１のグルコース単位ＢとＣとの間の）触媒部位から８グルコース単位の位置で基質を閉じ込め、γ－シクロデキストリン（８－グルコース単位）についての生成物選択性を増加させるであろう。更に、より小さいシクロデキストリン及び／又は直鎖オリゴサッカリドの形成は、図１のグルコース単位Ｃ～Ｈの潜在的分子内相互作用を減少させることにより、同時に削減され得る。
本発明の第４の好ましい実施形態において、図１のグルコース単位Ｊ～Ｍ、好ましくはＫ

及びＬ周囲の領域におけるより多くの分子内相互作用（例えばより多くの水素結合ポテンシャル）の導入は、（図１のグルコース単位ＢとＣとの間の）触媒部位から９グルコース単位の位置で基質を閉じ込め、δ－シクロデキストリン（９－グルコース単位）についての生成物選択性を増加させるであろう。更に、より小さなシクロデキストリン及び／又は直鎖オリゴサッカリドの形成は、図１のグルコース単位Ｃ～Ｈの潜在的分子内相互作用を減少させることにより、同時に削減され得る。

本発明の第５の好ましい実施形態において、図１のグルコース単位Ｋ～Ｎ、好ましくはＬ及びＭ周囲の領域におけるより多くの分子内相互作用（例えばより多くの水素結合ポテンシャル）の導入は、（図１のグルコース単位ＢとＣとの間の）触媒部位から10グルコース単位の位置で基質を閉じ込め、ε－シクロデキストリン（10－グルコース単位）についての生成物選択性を増加させるであろう。更に、より小さなシクロデキストリン及び／又は直鎖オリゴサッカリドの形成は、図１のグルコース単位Ｃ～Ｈの潜在的分子内相互作用を減少させることにより、同時に削減され得る。

本発明の第６の好ましい実施形態において、図１のグルコース単位Ｌ～Ｏ、好ましくはＭ及びＮ周囲の領域におけるより多くの分子内相互作用（例えばより多くの水素結合ポテンシャル）の導入は、（図１のグルコース単位ＢとＣとの間の）触媒部位から11グルコース単位の位置で基質を閉じ込め、ζ－シクロデキストリン（11－グルコース単位）についての生成物選択性を増加させるであろう。更に、より小さなシクロデキストリン及び／又は直鎖オリゴサッカリドの形成は、図１のグルコース単位Ｃ～Ｈの潜在的分子内相互作用を減少させることにより、同時に削減され得る。

第７の本発明の好ましい実施形態において、要求される長さの直鎖オリゴサッカリドの形成は、CGTase番号で位置195に相当する環化軸における置換と上述の条件を組み合わせることにより、増加され得る。

本発明の方法に係るCGTaseは、天然に見い出されるいずれかのCGTaseであり得る。しかしながら、CGTaseは好ましくは微生物の酵素、好ましくはバクテリアの酵素であり、そして好ましくは、CGTaseはバチルスの株、ブレビバクテリウムの株、クロストリジウムの株、コリネバクテリウムの株、クレブシエラの株、マイクロコッカスの株、サーモアナエロビウムの株、サーモアナエロバクターの株、サーモアナエロバクテリウムの株、又はサーモアクチノマイセスの株から得られる。

より好ましい実施形態において、CGTaseは、バチルス・アウトリチクス（Bacillus autolyticus）の株、バチルス・セレウス（Bacillus cereus）の株、バチルス・サーキュランス（Bacillus circulans）の株、バチルス・サーキュランス変種アルカロフィルス（Bacillus circulans var. alkalophilus）の株、バチルス・コアギュランス（Bacillus coagulans）の株、バチルス・フィルムス（Bacillus firmus）の株、バチルス・ハロフィルス（Bacillus halophilus）の株、バチルス・マセランス（Bacillus macerans）の株、バチルス・メガテリウム（Bacillus megaterium）、バチルス・オーベンシス（Bacillus ohbensis）の株、バチルス・ステアロサーモフィルス（Bacillus stearothermophilus）の株、バチルス・サブチルス（Bacillus subtilis）の株、クレブシエラ・ネウモニア（Klebsiella pneumonia）の株、サーモアナエロバクター・エタノリクス（Thermoanaerobacter ethanolicus）の株、サーモアナエロバクター・フィンニ（Thermoanaerobacter finnii）の株、クロストリジウム・サーモアミロリチウム（Clostridium thermoamylolyticum）の株、クロストリジウム・サーモサッカロリチウム（Clostridium thermosaccharolyticum）の株、又はサーモアナエロバクテリウム・サーモスルフリゲネス（Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes）の株から得られる。

最も好ましい実施形態において、CGTaseは、バチルス種株1011の株、バチルス種株38－２の株、バチルス種株17－１の株、バチルス種１－１の株、バチルス種株B1018の株、バチルス・サーキュランス株８の株、サーモアナエロバクター種ATCC 53627の株、又はバチルス・サーキュランス株251の株又はそれらの突然変異体もしくは変異体から得られる。

サーモアナエロバクター種ATCC 53627の株は、American Type Culture Collection（ATCC）（12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA）に1987年６月３日に特許

手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約に従って寄託されている。株バチルス・サーキュランス株251は、Rijksinstituut voor Volksg ezondheid（RIV），Bilthoven, The Netherlandにオープンコレクションにおいて寄託されており、受託番号RIV 11115が割り当てられ、これにより公共的に利用できる。

本発明の方法は、基質がその基質結合部位においてCGTase酵素に結合している場合に基質に近い位置を保持する酵素の１又は複数のアミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失を含む。更に詳しい態様において、本発明の方法は、２以上のアミノ酸残基、好ましくは３以上のアミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失を含む。

本発明の文脈において、基質に近い位置を保持するCGTaseアミノ酸残基は、基質のグルコース単位（即ちポリサッカリド）から潜在的に分子内（即ち酵素－基質）相互作用する距離以内であるように酵素内に位置するアミノ酸残基を示す。潜在的分子内相互作用の例は、これらに限定されないが、水素結合、塩橋形成、極性相互作用、疎水性相互作用、及び芳香族相互作用を含む。

本発明の好ましい実施形態において、基質に近いアミノ酸位置は、基質から８Å（オングストローム）未満、好ましくは５Å未満、更に好ましくは３Å未満の距離を示す。

本発明のより好ましい実施形態において、これらの距離は、その配置がエントリーコード1DIJ下でProtein Data Bank（Biology Department, Bldg. 463, Brookhaven National Laboratory, P. O. Box 5000, Upton, NY 11973-5000, USA）に寄託されているマルトナノースの誘導体と複合体化されたバチルス・サーキュランス株251からのCGTase［例えばLawson CL, van Montfort R, Strokopytov B, Rozeboom H J, Kalk K H, de Vries G E, Penning a D, Dijkhuizen L、及びDijkstra B W, J. Mol. Biol 1994（236）590-600］を用いて計算される。この構造の知見は、例えば表２、また表１にも言及される位置に相当する周知の一次構造を有する他のCGTaseにおける同様の位置を同定することを可能にする。CGTaseはその酵素のＡドメイン、Ｂドメイン、Ｃドメイン及びＥドメインに位置する基質結合領域を有する。結果として、好ましい実施形態において、本発明の方法は、その残基が表１の１又は複数のＡ，Ｂ，Ｃ及び／又はＥドメインに位置するCGTase酵素の１又は複数のアミノ酸残基を置換することを含む。

天然に見い出されるCGTase酵素の配列アラインメント及び分子モデリングにより、基質近くに位置したアミノ酸残基を同定することができる。配列アラインメントを用いることにより、いずれかの相同なCGTaseの三次構造を、周知の三次元CGTase構造に基づいてモデル形成することができる。

次の表２は、基質から８Å以内に位置し、それゆえ本発明の文脈中のものであると考えられるCGTaseアミノ酸位置のリストを供する。アミノ酸残基は、いずれかのCGTase酵素における対応するアミノ酸位置の同定を許容するCGTaseナンバリングにより同定される。

好ましくは、本発明の方法は、以下の表２に確認される１又は複数のアミノ酸残基における置換、挿入及び／又は欠失を含む。

表２

CGTaseナンバリングにより同定された基質位置から８Å未満のCGTaseアミノ酸残基

19	142	192	301	476	634
21	143	193	304	596	635
46	144	194	326	597	636
47	145	195	327	598	649
75	146	196	328	599	650
78	147	197	329	600	651
82	148	198	370	601	652
87	149	199	371	602	653
88	150	227	372	603	655
89	151	228	374	604	656
90	154	229	375	605	660
94	167	230	410	607	661
95	168	231	411	608	662
96	176	232	412	609	663
97	177	233	413	615	664
98	178	257	414	616	665
99	179	258	415	617	666
100	180	259	416	618	667
101	181	260	418	624	668
102	182	261	420	625	685
135	183	262	443	626	686
136	184	264	444	627	
137	185	266	445	628	
138	186	268	446	629	
139	187	281	447	631	
140	188	283	448	632	
141	189	287	449	633	

バチルス・サーキュランス株251から得られたCGTaseの分子モデリングにより、以下の表３～５に供されるアミノ酸位置を、基質に近い位置、即ち各々８Å、５Å及び３Åの位置として同定した。

より好ましい実施形態において、本発明の方法は、以下の表３～５に同定される１又は複数のアミノ酸残基において置換、挿入及び／又は欠失を含む。

表３

Ｂ．サーキュランス株251 において同定された基質位置から８Å未満のCGTaseアミノ酸残基（CGTaseナンバリング）

Gln-19	Ser-142	Gly-189	Phe-283	Leu-447	Val-629
Phe-21	Pro-143	Lys-192	Gln-287	Val-448	Tyr-631
Arg-47	Ala-144	Asn-193	Tyr-301	Thr-449	Gln-632
Trp-75	Ser-145	Leu-194	Lys-304	Ala-476	Tyr-633
Gln-78	Ser-146	Phe-195	Asn-326	Ala-596	Pro-634
Asn-82	Asp-147	Asp-196	His-327	Thr-597	Asn-635
Ile-87	Gln-148	Leu-197	Asp-328	Thr-598	Trp-636
Asn-88	Pro-149	Ala-198	Met-329	Ala-599	Glu-649
Tyr-89	Ser-150	Asp-199	Thr-370	Leu-600	Phe-650
Ser-90	Phe-151	Arg-227	Asp-371	Gly-601	Lys-651
Asn-94	Asn-154	Met-228	Pro-372	Gln-602	Phe-652
Thr-95	Tyr-167	Asp-229	Asn-374	Asn-603	Lys-655
Ala-96	Thr-168	Ala-230	Arg-375	Val-604	Gln-656
Tyr-97	His-176	Val-231	Gln-410	Tyr-605	Val-660
His-98	His-177	Lys-232	Glu-411	Thr-607	Thr-661
Gly-99	Asn-178	His-233	Arg-412	Gly-608	Trp-662
Tyr-100	Gly-179	Glu-257	Trp-413	Ser-609	Glu-663
Trp-101	Gly-180	Trp-258	Ile-414	Asn-615	Gly-664
Ala-102	Thr-181	Phe-259	Asn-415	Trp-616	Gly-665
Asp-135	Asp-182	Leu-260	Asn-416	Asp-617	Ser-666
Phe-136	Phe-183	Gly-261	Val-418	Pro-618	Asn-667
Ala-137	Ser-184	Val-262	Ile-420	Pro-624	His-668
Pro-138	Thr-185	Glu-264	Ser-443	Met-625	Gln-685
Asn-139	Thr-186	Ser-266	Ile-444	Tyr-626	Pro-686
His-140	Glu-187	Glu-268	Ser-445	Asn-627	
Thr-141	Asn-188	Leu-281	Gly-446	Gln-628	

表４

Ｂ．サーキュランス株251 において同定された基質位置から５Å未満のCGTaseアミノ酸残基（CGTaseナンバリング）

Tyr-89	Pro-149	Asn-193	Leu-260	Asn-415	Tyr-626
His-98	Ser-150	Leu-194	Gly-261	Gly-446	Asn-627
Tyr-100	Tyr-167	Phe-195	Glu-264	Leu-447	Gln-628
Trp-101	Gly-179	Asp-196	Tyr-301	Val-448	Tyr-633
Ala-137	Gly-180	Leu-197	His-327	Thr-598	Trp-636
His-140	Thr-181	Arg-227	Asp-328	Ala-599	Glu-649
Pro-143	Asp-182	Asp-229	Asp-371	Leu-600	Lys-651
Ala-144	Phe-183	Ala-230	Arg-375	Gly-601	Trp-662
Ser-145	Ser-184	Lys-232	Glu-411	Gln-602	Glu-663
Ser-146	Thr-185	His-233	Arg-412	Asn-603	Asn-667
Asp-147	Glu-187	Glu-257	Trp-413	Trp-616	
Gln-148	Asn-188	Phe-259	Ile-414	Met-625	

表５

Ｂ．サーキュランス株251 において同定された基質位置から３Å未満のCGTaseアミノ酸残基

Tyr-89	Asp-147	Asn-193	Phe-259	Thr-598	Gln-628
His-98	Gln-148	Phe-195	His-327	Ala-599	Tyr-633
Tyr-100	Gly-180	Asp-196	Asp-328	Leu-600	Trp-636
Trp-101	Asp-182	Asp-229	Asp-371	Gly-601	Lys-651
His-140	Phe-183	Lys-232	Glu-411	Gln-602	Asn-667
Ser-145	Ser-184	His-233	Ile-414	Asn-603	
Ser-146	Thr-185	Glu-257	Gly-446	Asn-627	

同様に、サーモアナエロバクター種ATCC 53627の株から得られたCGTaseの分子モデリングは、基質に近い位置、即ち各々８Å，５Å及び３Åの距離のものとして以下の表６～８に供されるアミノ酸位置を示した。

他の好ましい実施形態において、本発明の方法は、以下の表６～８に同定される１又は複数のアミノ酸残基における置換、挿入及び／又は欠失を含む。

表 6

サーモアナエロバクター種において同定された基質位置から 8 Å 未満のCGTaseアミノ酸残基（CGTaseナンバリング）

Gln-19	His-140	Tyr-186	Glu-264	Tyr-443	Met-625
Val-21	Thr-141	Glu-187	Asp-266	Ile-444	Phe-626
Leu-46	Ser-142	Asp-188	Asn-268	Thr-445	Asn-627
Lys-47	Pro-143	Gly-189	Leu-281	Gly-446	Gln-628
Trp-75	Ala-144	Arg-192	Phe-283	Leu-447	Gln-632
Gln-78	Ser-145	Asn-193	Gln-287	Tyr-448	Tyr-633
Asn-82	Glu-146	Leu-194	Tyr-301	Ser-476	Pro-634
Leu-87	Thr-147	Phe-195	Asn-326	Ala-596	Thr-635
Pro-88	Asp-148	Asp-196	His-327	Thr-597	Trp-636
Asp-89	Pro-149	Leu-197	Asp-328	Thr-598	Glu-649
Phe-91a	Thr-150	Ala-198	Met-329	Val-599	Phe-650
Ser-94	Tyr-151	Asp-199	Gly-370	Trp-600	Lys-651
Thr-95	Asn-154	Arg-227	Asp-371	Gly-601	Phe-652
Ser-96	Tyr-167	Met-228	Pro-372	Glu-602	Ile-653
Tyr-97	Thr-168	Asp-229	Asn-374	Asn-603	Lys-655
His-98	His-176	Ala-230	Arg-375	Val-604	Asn-656
Gly-99	His-177	Val-231	Lys-410	Tyr-605	Thr-661
Tyr-100	Tyr-178	Lys-232	Gln-411	Thr-607	Trp-662
Trp-101	Gly-179	His-233	Arg-412	Gly-608	Glu-663
Ala-102	Gly-180	Glu-257	Trp-413	Asn-609	Gly-664
Asp-135	Thr-181	Trp-258	Ile-414	Asn-615	Gly-665
Phe-136	Asn-182	Tyr-259	Asn-415	Trp-616	Tyr-666
Ala-137	Phe-183	Leu-260	Asn-416	Asp-617	Asn-667
Pro-138	Ser-184	Gly-261	Val-418	Thr-618	His-668
Asn-139	Ser-185	Thr-262	Ile-420	Pro-624	Gln-685

表 7

サーモアナエロバクター種において同定された基質位置から５Å未満のCGTaseアミノ酸残基（CGTaseナンバリング）

Lys-47	Asp-148	Asn-193	Gly-261	Thr-445	Gln-628
Ser-94	Pro-149	Leu-194	Glu-264	Gly-446	Tyr-633
Tyr-97	Thr-150	Phe-195	Asp-266	Leu-447	Trp-636
His-98	Tyr-151	Asp-196	Tyr-301	Tyr-448	Glu-649
Tyr-100	Tyr-167	Leu-197	His-327	Thr-598	Lys-651
Trp-101	Gly-179	Arg-227	Asp-328	Val-599	Trp-662
Ala-137	Gly-180	Asp-229	Asp-371	Trp-600	Glu-663
His-140	Thr-181	Ala-230	Arg-375	Gly-601	Gly-665
Pro-143	Asn-182	Lys-232	Gln-411	Glu-602	Asn-667
Ala-144	Phe-183	His-233	Arg-412	Asn-603	
Ser-145	Ser-184	Glu-257	Trp-413	Trp-616	
Glu-146	Ser-185	Tyr-259	Ile-414	Met-625	
Thr-147	Tyr-186	Leu-260	Asn-415	Asn-627	

表 8

サーモアナエロバクター種において同定された基質位置から３Å未満のCGTaseアミノ酸残基

His-98	Thr-147	Phe-195	Asp-328	Thr-598	Asn-627
Tyr-100	Gly-180	Asp-229	Asp-371	Val-599	Tyr-633
Trp-101	Phe-183	His-233	Arg-375	Trp-600	Lys-651
His-140	Ser-184	Glu-257	Gln-411	Gly-601	Asn-667
Ser-145	Ser-185	Tyr-259	Ile-414	Glu-602	
Glu-146	Asn-193	His-327	Gly-446	Asn-603	

上述のように、本発明のCGTase変異体の基質結合及び生成物選択性は、CGTase変異体とその基質との間の潜在的分子内相互作用を除去し、存在させ及び／又は導入することによりデザインすることができる。

分子内相互作用の例は、これに限定されないが、水素結合、塩橋形成、極性相互作用、疎水性相互作用、及び芳香族相互作用を含む。

水素結合ポテンシャル（即ちH結合能力を有する）側鎖を有するアミノ酸残基は一般に次のもの：

Ser（S），Thr（T），Asn（N），Gln（Q），His（H），Asp（D），Tyr（Y），Glu（E），Lys（K），Arg（R），Trp（W）及びCys（C）である。

対応して、次のアミノ酸は一般に側鎖水素結合を形成する潜在的能力を有さない（即ちH結合能がない）。

Ala（A），Val（V），Leu（L），Ile（I），Phe（F），Gly（G），Met（M）及びPro（P）。
塩橋形成ポテンシャルを有する側鎖を有するアミノ酸残基は一般に次のものである：Asp（D），Glu（E），Lys（K），Arg（R）及びHis（H）。
極性相互作用ポテンシャルを有する側鎖を有するアミノ酸残基は一般に次のものである：Asp（D），Asn（N），Glu（E），Gln（Q），Lys（K），Arg（R），His（H），Tyr（Y），Trp（W）及びCys（C）。
疎水性相互作用ポテンシャルを有する側鎖を有するアミノ酸残基は一般に次のものである：
Ala（A），Val（V），Leu（L），Ile（I），Phe（F），Met（M），Pro（P）並びにGlu（E）及びGln（Q）側鎖の一部。
芳香族相互作用ポテンシャルを有する側鎖を有するアミノ酸残基は一般に次のものである：
His（H），Phe（F），Tyr（Y）及びTrp（W）。
CGTase変異体
その第２の態様において、本発明は、天然では見い出されないアミノ酸配列を有する新規のCGTase変異体を提供する。機能的に、本発明のCGTase変異体は前駆体CGTase酵素（即ちネイティブ、親、又は野生型酵素）の誘導体として考えられる。
本発明のCGTase変異体において、基質結合及び／又は生成物選択性は、基質に近い位置を保持する１又は複数のアミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失により前駆体CGTase酵素と比べて改良されている。
本発明のCGTase変異体は、天然に見い出されるいずれかのCGTase酵素から得ることができる。しかしながら、本発明のCGTaseは、好ましくは、微生物の酵素、好ましくはバクテリアの酵素から得られ、そして好ましくは、CGTase変異体は、バチルスの株、ブレビバクテリウムの株、クロストリジウムの株、コリネバクテリウムの株、クレブシエラの株、マイクロコッカスの株、サーモアナエロビウムの株、サーモアナエロバクターの株、サーモアナエロバクテリウムの株、又はサーモアクチノマイセスの株から得られる。
より好ましい実施形態において、本発明のCGTase変異体は、バチルスアウトリチクスの株、バチルス・セレウスの株、バチルス・サーキュランスの株、バチルス・サーキュランス変種アルカロフィルスの株、バチルス・コアギュランスの株、バチルスフィルムスの株、バチルス・ハロフィルスの株、バチルス・マセランスの株、バチルス・メガテリウムの株、バチルスオーベンシスの株、バチルス・ステアロサーモフィルスの株、バチルス・サブチルスの株、クレブシエラ・ネウモニアの株、サーモアナエロバクター・エタノリクスの株、サーモアナエロバクター・フィンニの株、クロストリジウム・サーモアミロリチクムの株、クロストリジウム・サーモサッカロリチクムの株、又はサーモアナエロバクテリウム・サーモスルフリゲネスの株から得られる。
最も好ましい実施形態において、本発明のCGTase変異体は、バチルス種株1011の株、バチルス種株38－２の株、バチルス種株17－１の株、バチルス種１－１の株、バチルス種株B1018の株、バチルス・サーキュランス株８の株、バチルス・サーキュランス株251の株、もしくはサーモアナニロバクター種ATCC 53627の株、又はそれらの突然変異体もしくは変異体から得られる。
本発明の文脈において、基質に近い位置を保持するアミノ酸残基は、基質のグルコース単位（即ちポリサッカリド）から潜在的に分子内（即ち酵素－基質）相互作用する距離内にあるように酵素内に位置したアミノ酸を示す。
潜在的な分子内相互作用の例は、これらに限定されないが、水素結合、塩橋形成、極性相互作用、疎水性相互作用、及び芳香族相互作用を含む。
本発明の好ましい実施形態において、基質に近いアミノ酸位置は、基質から８Å（オングストローム）未満、好ましくは５Å未満、更に好ましくは３Å未満の距離を示す。
更に、CGTaseは、Ａドメイン、Ｂドメイン、Ｃドメイン及びＥドメインに位置した基質結合領域を有する。結果として、好ましい実施形態において、本発明は、変異体内で置換、

挿入及び／又は欠失が、１又は複数のＡ，Ｂ，Ｃ及びＥドメイン内に位置した１又は複数のアミノ酸残基で導入されているCGTase変異体を提供する。
他の好ましい実施形態において、本発明は、変異体内で、置換、挿入及び／又は欠失が、表２に言及される位置に相当する１又は複数のアミノ酸位置で導入されているCGTase変異体を提供する。
しかしながら、位置195及び198（CGTaseナンバリング）における置換が行われているなら、CGTaseは、１又は複数のアミノ酸残基における更なる置換、挿入及び／又は欠失が導入されていないなら、本発明のCGTase変異体として考慮されない。更に、次の特定の変異体：H140R，H140N，F183L，H233R，H233N，W258V，F259L，F259I，F259Y，F283L，H327R，H327N，T598F及び／又はW636Fのいずれかを含むCGTaseは、本明細書で言及される一以上の位置においてアミノ酸残基の更なる置換、挿入及び／又は欠失が導入されていなければ、本発明のCGTase変異体として考慮されない。最後に、次の特定の変異：F195Y／F259Y，W258V／F259I，T598F／W636F、及びF183L／F259Lのいずれかを含むCGTaseは、１以上の位置でアミノ酸残基の更なる置換、挿入及び／又は欠失が導入されていなければ本発明のCGTase変異体として考慮されない。それゆえ、上述のようなCGTase変異体は本発明によりクレームされない。
より好ましい実施形態において、本発明のCGTase変異体は、その酵素が表３～５に言及される位置に相当する１又は複数のアミノ酸位置で置換、挿入及び／又は欠失により改良されているバチルスの株から得られる酵素から得られるCGTase変異体である。好ましくは、CGTase変異体は、バチルスアウトリチクスの株、バチルス・セレウスの株、バチルス・サーキュランスの株、バチルス・サーキュランス変種アルカロフィルスの株、バチルス・コアギュランスの株、バチルスフィルムスの株、バチルス・ハロフィルスの株、バチルス・マセランスの株、バチルス・メガテリウムの株、バチルスオーベンシスの株、バチルス・ステアロサーモフィルスの株、又はバチルス・サブチルスの株から得られる。
最も好ましくは、GTase変異体は、バチルス種株1011の株、バチルス種株38－２の株、バチルス種株17－１の株、バチルス種１－１の株、バチルス種株B1018の株、バチルス・サーキュランス株８の株、もしくはバチルス・サーキュランス株251の株、又はそれらの突然変異体もしくは変異体から得られる。
他の好ましい実施形態において、本発明のCGTaseは、酵素が表６～８に言及される位置に相当する１又は複数のアミノ酸位置において置換、挿入及び／又は欠失により改良されているサーモアナエロバクターの株から得られうる酵素から得られるCGTase変異体である。好ましくは、CGTase変異体は、サーモアナエロバクター種ATCC 53627の株又はそれらの突然変異体もしくは変異体から得られる。
本発明のCGTase変異体において、前駆体酵素と比較して、細胞内酵素／基質相互作用が改良されている。潜在的分子内相互作用の例は、これらに限定されないが、水素結合、塩橋形成、極性相互作用、疎水性相互作用、及び芳香族相互作用を含む。このような改良は、以下の案内に従って、上述の１以上の位置における置換、挿入及び／又は欠失により行うことができる。
水素結合ポテンシャル（即ちH結合能力を有する）側鎖を有するアミノ酸残基は一般に次のもの：
Ser（S），Thr（T），Asn（N），Gln（Q），His（H），Asp（D），Tyr（Y），Glu（E），Lys（K），Arg（R），Trp（W）及びCys（C）である。
対応して、次のアミノ酸は一般に側鎖水素結合を形成する潜在的能力を有さない（即ちH結合能がない）。
Ala（A），Val（V），Leu（L），Ile（I），Phe（F），Gly（G），Met（M）及びPro（P）。
塩橋形成ポテンシャルを有する側鎖を有するアミノ酸残基は一般に次のものである：
Asp（D），Glu（E），Lys（K），Arg（R）及びHis（H）。
極性相互作用ポテンシャルを有する側鎖を有するアミノ酸残基は一般に次のものである：
Asp（D），Asn（N），Glu（E），Gln（Q），Lys（K），Arg（R），His（H），Tyr（Y），

Trp（W）及びCys（C）。
疎水性相互作用ポテンシャルを有する側鎖を有するアミノ酸残基は一般に次のものである：
Ala（A），Val（V），Leu（L），Ile（I），Phe（F），Met（M），Pro（P）並びにGlu（E）及びGln（Q）側鎖の一部。
芳香族相互作用ポテンシャルを有する側鎖を有するアミノ酸残基は一般に次のものである：
His（H），Phe（F），Tyr（Y）及びTrp（W）。
本発明の方法により、活性クレフトもしくはこのクレフトに導く溝のサブ部位内又はマルトース結合部位上で変化した数の水素結合は他の相互作用を有する変異体が得られる。結合クレフト中でサブ部位を変えることにより、結合できる糖の数を操作し、これにより酵素によって作られるα－，β－，γ－シクロデキストリン等の比を変えることが可能になる。
特に、α－シクロデキストリン形成性CGTase変異体の作製を行う場合、基質のサブ部位Ｃ－Ｉ上又はその前の相互作用（図１）は増加されるべきであり、そしてサブ部位Ｉ以上の相互作用は減少されるべきである。あるいは、サブ部位Ｉ以上の結合を防ぐために立体障害が適用され得よう。例えば、バチルスCGTaseから始めて、以下の変異体が別個に又は組み合わせて作られる。
酵素とドナー／アクセプターとの間、即ちCGTaseとサブ部位Ａ，Ｂ，Ｃ及びＤとの間の相互作用を除去することにより、より少いカップリング及び不均化活性が達成される。水素結合を除去する変異は、例えば：H233Q，D135L，R47L又はR47Qである。
基質に対する水素結合が増加された変異は、例えば次のものである：
H233Q（基質のサブ部位Ｂに対するもの）、L197DもしくはL197E（サブ部位Ｄ）、N94Q，N94K，N94R，N94WもしくはN94F（サブ部位Ｅ）、D371NもしくはD371G（サブ部位Ｅ＋Ｆ）、Y89D（サブ部位Ｅ）、A144K，A144RもしくはA144D（サブ部位Ｈ）、N193DもしくはN193E（サブ部位Ｈ）、Y167F（サブ部位Ｈへの水素結合のための位置193の残基を放離するためのもの）、並びにT185R，T185E、もしくはT185D（以下のようなマルトース結合部位２上）。
基質結合クレフトの構造を変えて、これにより新しい酵素－基質相互作用を作る変異は、例えば次のものである：
N88P及びP143G。
基質に対する水素結合を減少させる変異は例えば次のものである：
S145E又はS145A、及びS146P，S146QもしくはS146G（基質のサブ部位Ｉに対するもの）。
サブ部位Ｈに対する水素結合を増加させる変異は例えばA144Rである。
サブ部位に対する水素結合を増加させる変異は、例えばN88Kである。
立体障害を導く変異は例えば次のものである：
S145W，S145Y又はS145F、及びS146W，S146I，S146RもしくはS146P（基質のサブ部位Ｉ上の結合を防ぐもの）
静電相互作用（スタッキング）を増加させる変異は例えば次のものである：
L600W，L600F又はL600Y（以下のマルトース結合部位のもの）。
好ましい実施形態において、本発明のα－シクロデキストリン形成性CGTase変異体は、位置87～94において部分的アミノ酸配列IKYSGVNNを含み、及び／又は位置143～151において部分的アミノ酸配列GRAGTNPGFを含み、又は位置143～145において部分的アミノ酸配列GRWを含む変異体であり得る。
β－シクロデキストリンに対して改良された生成物選択性を有する酵素を作るために、より小さな及びより大きな環式生成物の生産を回避することが必要である。原理的には、基質が活性部位内により迅速に動くことを可能にする酵素と基質との間の水素結合を除去することにより、α－シクロデキストリンの生産を防ぐことができよう。逆に、関連位置における水素結合の導入は、基質の動きを遅めて、より大きなシクロデキストリンの割合を導く。基質の動きをブロックするようデザインされた位置におけるより小さなアミノ酸残

基について立体障害を引きおこすアミノ酸残基の置換と組み合わせたこの試みは、β－シクロデキストリンより大きいシクロデキストリンの形成を防ぐ。それゆえ、β－シクロデキストリン形成性CGTase変異体の作製が考えられるなら、バチルスCGTaseから始めて別個に又は組み合わせて以下の変異体が考えられる。
活性部位近くの基質結合クレフトの構造を変え、これによりより大きなシクロデキストリン（β－及びγ－シクロデキストリン）のための空間を形成する変異は、例えば次のものである：
N88P，Y89*（欠失），91aY（挿入），V92*又はN92*、及びN94*
基質に対する水素結合を増加させる変異は、例えばS146Eである。
基質に対する水素結合を減少させる変異は、例えばS145L及びQ148Nである。
基質のサブ部位D，E，F，H，I及びJから水素結合を除去する変異は例えば次のものである：
R375G，D371G，D317N，Y89G，N193G，S145A，Q148A、及び*145aI。
基質のサブ部位IとJとの間に立体障害を導入し、より小さなシクロデキストリンの生産に対する生産比を変えるようデザインされた変異体は例えばD147Wである。
好ましい実施形態において、本発明のβ－シクロデキストリン形成性CGTase変異体は、位置87～94において部分的アミノ酸配列HP* SGY**を含み、及び／又は位置143～151において部分的アミノ酸配列PALETNPNFを含み、又は位置143～151において部分的アミノ酸配列PAAETWPAFを含む変異体であり得る。
好ましい実施形態において、本発明のβ－シクロデキストリン形成性CGTase変異体は、位置87～94において部分的アミノ酸配列HP* SGY**を含み、及び／又は位置143～151において部分的アミノ酸配列PALETNPNFを含み、又は位置143～151において部分的アミノ酸配列PAAETWPAFを含む変異体であって、位置195がロイシン残基を保持する（X195L）ものであり得る。
第３の好ましい実施形態において、直鎖オリゴサッカリドを形成することができる本発明のCGTase変異体は、位置87～94において部分的アミノ酸配列HP* SGY**を含み、及び／又は位置143～151において部分的アミノ酸配列PALETNPNFを含み、又は位置143～151において部分的アミノ酸配列PAAETWPAFを含む変異体であって、位置195においてグリシン残基を保持する（X195G）を保持するものであり得る。
同様に、γ－シクロデキストリン形成性CGTase変異体の作製が考えられるなら、再びバチルスCGTaseから始めて、別個に又は組み合わせて以下の変異が考えられる。
活性部位に近い基質結合クレフトの構造を変え、それによりより大きなシクロデキストリン（β－及びγ－シクロデキストリン）のための空間を形成する変異は例えば次のものである。
N88P，Y89*（欠失），91aY（挿入），V92*又はN92*、及びN94*
基質に対する水素結合を増加させる変異は例えばS146Eである。
基質に対する水素結合を減少させる変異は例えばS145L及びQ148Nである。
基質のサブ部位D，E，F及びHから水素結合を除去する変異は、例えば次のものである：
N193G，R375G，D371G、及びD371N。
基質のサブ部位D，E，F及びHから水素結合及び疎水性スタッキングを除去する変異は、例えばY89Gである。
基質のサブ部位I及びJにおいて結合特性を変化させる変異は、例えば次のものである：X145aI又は*145aI（挿入），S145A、及びQ148E、特にS145A／X145aI又はA145A／*145aI、並びにX145aI／Q148E又は*145aI／Q148E。
サブ部位A，D及びEにおいてカップリング活性を減少させる変異は、例えば次のものである。
R375G，D371G，K232Q、及びE264Q。
シクロデキストリンの特定の結合を変えることによりカップリング活性を減少させる変異は例えばR47Qである。

特に、活性部位に近い水分子を除去することにより得られるより少い加水分解を導くサーモアナエロバクターの株から得られるCGTase変異体を考慮する場合は、例えばV21F又はV21Yである。
より少いカップリング及び不均化活性は、酵素とドナー／アクセプターとの間、即ちCGTaseとサブ部位Ａ，Ｂ，Ｃ及びＤの間の相互作用を除去することにより達成される。水素結合を除去する変異は、例えばY259F，H233Q及びD135Lである。
好ましい実施形態において、本発明のγ－シクロデキストリン形成性CGTase変異体は、位置87～94において部分的アミノ酸配列HP* SGY**を含み、及び／又は位置143～151において部分的アミノ酸配列PALETNPNFを含み、又は位置143～151において部分的アミノ酸配列PAAEADPNFを含む変異体であり得る。
他の好ましい実施形態において、本発明のγ－シクロデキストリン形成性CGTase変異体は、位置87～94において部分的アミノ酸配列HP* SGY**を含み、及び／又は位置143～151において部分的アミノ酸配列PALETNPNFを含み、又は位置143～151において部分的アミノ酸配列PAAEADPNFを含む変異体であって、位置195がロイシン残基を保持する（X195W）ものであり得る。
第３の好ましい実施形態において、要求される長さの直鎖オリゴヌクレオチドを得るために、本発明の変異体は、CGTaseナンバリングで位置195に相当する環化軸を形成する中心アミノ酸残基の置換と組み合わせられ得る。この位置において、チロシン及びフェニルアラニンが野生型CGTaseにおいて支配的である（表１）。この残基を変えることにより、環化特性が影響を受け、そして環化が妨げられる。好ましい実施形態において、グリシンはこの部分に導入される（X195G）。
更に他の好ましい実施形態において、本発明の変異体は以下の表９に示される位置に相当する１以上のアミノ酸位置における置換、挿入及び／又は欠失により改良されている酵素である。この表に示すように、これらの１以上の置換／挿入／欠失の導入は、α－，β－又はγ－シクロデキストリン各々に関する生成物選択性の増加したCGTase変異体を導く。

表9

生成物選択性の増加したCGTase変異体CGTaseナンバリングにより同定した位置

位置	α－シクロデキストリン	β－シクロデキストリン	γ－シクロデキストリン
21	F,Y	F,Y	F,Y
47	Q,L	A,Q,H,R,L	A,Q,H,R,L
87	I,H	I,H	I,H
88	P,N,K,H	P,N,K,H	P,N,K,H
89	D,G,A,Y,E,*	D,G,A,E,K,R,Y,P,*	D,G,A,Y,P,*
90	S	G,A,S	G,A,S
91	A,V,D,G,T	A,V,G,S,T	A,V,G,S
91a	A,V,G,Y,*	A,V,G,Y,F,*	A,V,G,Y,F,*
92	G,V,*	G,V,*	G,V,*
93	G,N,*	G,N,H,T,*	G,N,H,T,*
94	Q,K,R,W,F,N,S,*	Q,K,R,W,F,N,S,*	Q,K,R,W,F,N,S,*
98	H	G,A	G,A
101	W	G,A	G,A,F,Y
135	L,D	L,D	L,D
140	A,R,N	A,R,N	A,R,N
143	G,S,A	P	P
144	K,R,D,A,N,E,Q	A	A
145	A,E,W,P,G,F,Y,P,R,K	A,E,L,W	A,E,L,W
145a	P,A,F,Q,S,W,I,R,*	P,A,I,Q,S	I,A,Q,P,S
146	P,A,F,Q,S,W,I,R,G,E,*	P,A,I,Q,S,E,K,D,N,R,F,W,*	I,A,Q,P,S,E
147	A,L,I,F,T,*	A,L,I,F,W,G,Y,R,D,T,*	S,T,A,D
147a	*	*	D,N,E,Q,T
148	G,A,N	G,A,N,Q	D,E,R,K,Y,F,N,Q
149	P	W,P	L,I,F,W,P
150	A,G	A,S	A,S,N
167	P,F,Y	A,F,Y	A,F,P,Y

168	S,T	S,T	S,T
178	N,Y	N,Y	N,Y
179	S,N,D	G,S,N,D	G,S,N,D
180	S,N,D	G,S,N,D	G,S,N,D
183	F,W,Y,A	F,W,Y,A	F,W,Y,A
185	P,H,R,E,D	P,H,R,E,D	P,H,R,E,D
192	K,R	K,R	K,R
193	G,D,E,N,Q	G,A,N	G,A,N
195	Y,F	L,I,W,Y,F	L,I,W,F,Y
196	A,D,N,S	A,D,N,S	A,D,N,S
197	D,E,L	D,E,L	D,E,L
232	K,Q,L	K,Q,L	K,Q,L
233	H,Q,N,I	H,Q,N,I	H,Q,N,I
259	F,W,Y,A	F,W,Y,A	F,W,Y,A
264	Q	Q	Q
326	Q,F,L	Q,F,L	Q,F,L
370	G	T,N	T,N
371	A,D,S,N,G,E,Q	A,G,N,D,S	A,G,N,V,L,I,D,S
373	D,N,Y	D,E,Y	D,E,Y
375	R,K	A,P,G,R,K	A,P,G,R,K
600	X	X	X

X＝いずれかの天然のアミノ酸残基

＊＝欠失又は欠損残基

生成物結合及び生成物障害に関して、バチルス・サーキュランス株251 CGTaseのEドメインが生デンプン結合ドメインとして同定された。マルトース依存性結晶構造において、これらの分子間の接触点上の各々の酵素分子（マルトース結合部位、MBS）において３つのマルトース分子が見い出された。これらのマルトースの２つはEドメイン上の特定の部位（MBS１及びMBS２、616及び662の近く）に結合し、第３の部位はCドメイン（MBS３，413の近く）に位置する。これにより、Eドメイン上の結合部位は生デンプンをシクロデキストリンに転化するのに必要とされる。以下に行われる実験は、酵素がMBS１により生デンプン粒子に結合し、他方MBS２は粒子活性部位に伸びるデンプン鎖を誘導する。

他の好ましい実施形態において、本発明のCGTase変異体は、以下の表10に示される位置に相当する１以上のアミノ酸位置における置換、挿入及び／又は欠失により改良されている酵素である。このような改良は生成物阻害の減少したCGTase変異体を導く。

例えば、本発明の文脈において、生成物阻害を減少させるために、別個に又は組み合わせて、バチルスCGTaseから始めて、以下の変異が考えられる。

非競合的生成物阻害を減少させる変異は次のものである：

Y633A（MBS２上にある、この変異は非競合的生成物阻害を完全に除去する）、599aP，559aR又は599aH、及びL600R。

残基595～605はMBS２の次のループを形成する。挿入はループを大きくし、それにより立

体障害によりMBS２へのシクロデキストリンの結合を防ぐ一方、基質鎖の誘導におけるMBS２の役割が保存される。位置600及び隣接する残基での変異は、環式生成物のMBS２への結合を減少させることができる一方、直鎖基質の結合は影響を受けない。位置600でのロイシンのアスパラテート、アラニン又はグリシンでの置換は生成物阻害に少しの効果かある。アルギニンでの置換は、その大きなサイズ及び荷電した性質のため、シクロデキストリンの結合に影響を与え、それにより生成物阻害を減少させる。

生成物のアフィニティーを減少させるMBS１周囲の静電相互作用を減少させる変異は、例えばW616A及び／又はW662Aである。

生成物のアフィニティーを減少させるMBS２周囲の静電相互作用を減少させる変異は、例えばL600A又はL600S、及び／又はY663Aである。

生成物アフィニティーを減少させるMBS３周囲の静電相互作用を減少させる変異は、例えばW413Aである。

カップリング反応により引きおこされる競合的生成物阻害が考えられる。このカップリング反応の減少は、第１（シクロデキストリン）及び第２（マルトーオリゴサッカリド）基質の結合を減少させることにより達成され得る。

シクロデキストリン結合を減少させることにより競合的生成物阻害を減少させる変異は、例えば次のものである。

R47A，R47Q又はR47L，Y89G，D196A又はD196L，D371G，D371N，D371A又はD371L及びR375G，R375Q，R375N，R375A又はR375L。

第２基質の結合を減少させることにより競合的生成物阻害を減少させる変異は、例えば次のものである。

K232Q，K232N，K232A又はK232L，E264A，E264N又はE264L，T186A及びE268A。

表10

生成物阻害の減少したCGTase変異体CGTaseナンバリングにより同定された位置

47	A,Q,L
89	G
100	A,I,L,F,Y
185	R,E,D
186	A
196	A,L,D
232	K,Q,N,A,L
264	A,N,L
268	A
339	A、
371	G,N,A,L,D,S,E,Q
375	G,Q,N,A,L,R,K
382	A,L,V
384	A,L,V
413	A,V,G,W
598	A,V,G,P,T
599a	P,R,H
600	X
603	A,V,L,G,N
616	A,I,L,G,W
626	A,I,V,L,G
627	A,V,L,G,N
628	A,V,L,G,Q
633	A,V,L,I,G,Y
636	I,L,A,G,W
649	A,G
651	A,G,V,K
662	A,L,I,G,W
667	A,N

Ｘ＝いずれかの天然のアミノ酸残基

好ましい実施形態において、本発明のCGTase変異体は、その酵素が以下の表11に示される位置に相当する１以上のアミノ酸位置における置換、挿入及び／又は欠失により改良されているバチルスの株から得られうる酵素から得られるCGTase変異体である。このような改

良は表に示されるように、生成物選択性の増加したCGTase変異体を導く。
より好ましくは、CGTase変異体は、バチルスアウトリチクスの株、バチルス・セレウスの株、バチルス・サーキュランスの株、バチルス・サーキュランス変種アルカロフィルスの株、バチルス・コアギュランスの株、バチルスフィルムスの株、バチルス・ハロフィルスの株、バチルス・マセランスの株、バチルス・メガテリウムの株、バチルスオーベンシスの株、バチルス・ステアロサーモフィルスの株、バチルス・サブチルスの株から得られる。
更に好ましくは、CGTase変異体は、バチルス種株1011の株、バチルス種株38－２の株、バチルス種株17－１の株、バチルス種１－１の株、バチルス種株B1018の株、バチルス・サーキュランス株８の株、もしくはバチルス・サーキュランス株251の株、又はそれらの突然変異体もしくは変異体から得られる。

表11

生成物選択性の増加したバチルス由来CGTase変異体CGTaseナンバリングにより同定された位置

位置	α－シクロデキストリン	β－シクロデキストリン	γ－シクロデキストリン
21	F,Y	F,Y	F,Y
47	Q,L	A,Q,H,R,L	A,Q,H,R,L
87	H	H	H
88	P,N,K,H	P,N,K,H	P,N,K,H
89	D,G,A,E,*	D,G,A,E,K,R,P,*	D,G,A,P,*
90	-	G,A	G,A
91	A,V,D,T	A,V,S,T	A,V,S
91a	A,V,G,Y,*	A,V,G,Y,F,*	A,V,G,Y,F,*
92	G,*	G,*	G,*
93	G,*	G,H,T,*	G,H,T,*
94	Q,K,R,W,F,S,*	Q,K,R,W,F,S,*	Q,K,R,W,F,S,*
98	-	G,A	G,A
101	-	G,A	G,A,F,Y
135	L	L	L
140	A,R,N	A,R,N	A,R,N
143	G,S	P	P
144	K,R,D,A,N,E,Q	A	A
145	A,E,W,P,G,F,Y,P,R,K	A,E,L,W	A,E,L,W
145a	P,A,F,Q,S,W,I,R,*	P,A,I,Q,S	I,A,Q,P,S
146	P,A,F,Q,S,W,I,R,G,E,*	P,A,I,Q,S,E,K,D,N,R,F,W,*	I,A,Q,P,S,E
147	A,L,I,F,*	A,L,I,F,W,G,Y,R,D,T,*	S,T,A,D
147a	*	*	D,N,E,Q,T
148	G,A,N	G,A,N	D,E,R,K,Y,F,N
149	-	W	L,I,F,W
150	A,G	A	A,S,N
167	P,F	A,F	A,F,P
168	S,T	S,T	S,T
178	N,Y	N,Y	N,Y

179	S,N,D	S,N,D	S,N,D
180	S,N,D	S,N,D	S,N,D
183	W,Y,A	W,Y,A	W,Y,A
185	P,H,R,E,D	P,H,R,E,D	P,H,R,E,D
192	K,R	K,R	K,R
193	G,D,E,Q	G,A	G,A
195	F	L,I,W,F	L,I,W,F
196	A,S,N,G	A,S,N,G	A,S,N,G
197	D,E	D,E	D,E
232	Q,L	Q,L	Q,L
233	Q,N,I	Q,N,I	Q,N,I
259	F,W,A	F,W,A	F,W,A
264	Q	Q	Q
326	Q,F,L	Q,F,L	Q,F,L
370	G	T,N	T,N
371	A,S,N,G,E,Q	A,G,N,S	A,G,N,V,L,I,S
373	D,N,Y	D,E,Y	D,E,Y
375	-	A,P,G,K	A,P,G,K
600	X	X	X

X＝いずれかの天然のアミノ酸残基

－ ＝保存性残基

＊ ＝欠失又は欠損残基

他の好ましい実施形態において、本発明のCGTase変異体は、酵素が以下の表12に示される位置に相当する１以上のアミノ酸における置換、挿入及び／又は欠失により改良されているバチルスの株から得られうる酵素から得られたCGTase変異体である。このような改良は、生成物阻害の減少したCGTase変異体を導く。

表12

生成物阻害の減少したバチルス由来CGTase変異体CGTaseナンバリングにより同定された位置

47	A,Q,L
89	G
100	A,I,L,F
185	R,E,D
186	A
196	A,L
232	Q,N,A,L
264	A,N,L
268	A
339	A
371	G,N,A,L,S,E,Q
375	G,Q,N,A,L,K
382	A,L,V
384	A,L,V
413	A,V,G
598	A,V,G,P
599a	P,R,H
600	X
603	A,V,L,G
616	A,I,L,G
626	A,I,V,L,G
627	A,V,L,G
628	A,V,L,G
633	A,V,L,I,G
636	I,L,A,G
649	A,G
651	A,G,V
662	A,L,I,G
667	A

X＝いずれかの天然のアミノ酸残基

その最も好ましい実施形態において、本発明は以下のCGTase変異体を提供する：
位置21においてチロシン残基を保持するCGTase変異体（F21Y）。
位置47においてグルタミン残基（R47Q）、アラニン残基（R47A）、ロイシン残基（R47L）

、又はヒスチジン残基（R47H）を保持するCGTase変異体。
位置88においてプロリン残基（N88P）又はリシン残基（N88K）を保持するCGTase変異体。
位置89においてアスパラギン酸残基（Y89D）、アラニン残基（Y89A）、又はグリシン残基（Y89G）を保持するCGTase変異体。
位置91ａ（挿入）においてアラニン残基（*91aA）又はチロシン残基（*91aY）を保持するCGTase変異体。
変異体位置92ａが削除されている（Ｖ92*）CGTase変異体。
位置94においてグルタミン残基（N94Q）、リシン残基（N94K）、アルギニン残基（N94R）、トリプトファン残基（N94W）、もしくはフェニルアラニン残基（N94F）を保持するか、又は変異体位置94が削除されている（N94*）CGTase変異体。
位置135においてロイシン残基を保持するCGTase変異体（D135L）。
位置143において野生型酵素のそれと異なる天然アミノ酸残基を保持するCGTase変異体（P143X）。
位置143においてアラニン残基（P143A）又はグリシン残基（P143G）を保持するCGTase変異体。
位置144において野生型酵素のそれと異なる天然のアミノ酸残基を保持するCGTase変異体（A144X）。
位置144においてアルギニン残基（A144R）、リシン残基（A144K）、又はアスパラギン酸残基（A144D）を保持するCGTase変異体。
位置145において野生型酵素のそれと異なる天然のアミノ酸残基を保持するCGTase変異体（S145X）。
位置145においてアラニン残基（S145A）、グルタミン酸（S145E）、又はトリプトファン残基（S145W）、グリシン残基（S145G）、フェニルアラニン残基（S145F）、チロシン残基（S145Y）、又はロイシン残基（S145L）を保持するCGTase変異体。
位置145a（挿入）において天然のアミノ酸残基を保持するCGTase変異体（*145aX）。
位置145a（挿入）においてイソロイシン残基を保持するCGTase変異体（*145aI）。
位置146において野生型のそれと異なる天然のアミノ酸残基を保持するCGTase変異体（S146X）。
位置146においてプロリン残基（S146P）、イソロイシン残基（S146I）、グルタミン残基（S146Q）、トリプトファン残基（S146W）、アルギニン残基（S146R）、又はグルタミン酸残基（S146E）を保持するCGTase変異体。
位置147において野生型酵素のそれと異なる天然のアミノ酸残基を保持するCGTase変異体（D147X）。
位置147においてイソロイシン残基（D147I）、ロイシン残基（D147L）、アラニン残基（D147A）、セリン残基（D147S）、又はトリプトファン残基（D147W）を保持するCGTase変異体。
位置147a（挿入）においてアラニン残基を保持するCGTase変異体（*147aA）。
位置147a（挿入）において天然のアミノ酸残基を保持するCGTase変異体（*147aX）。
位置148において野生型酵素のそれと異なる天然のアミノ酸残基を保持するCGTase変異体（Q148X）。
位置148においてアラニン残基（Q148A）、グリシン残基（Q148G）、グルタミン酸残基（Q148E）、又はアスパラギン酸残基（Q148N）を保持するCGTase変異体。
位置149において野生型酵素のそれと異なる天然のアミノ酸残基を保持するCGTase変異体（P149X）。
位置149においてイソロイシン残基を保持するCGTase変異体（P149I）。
位置167においてフェニルアラニン残基を保持するCGTase変異体（Y167F）。
位置179においてセリン残基（G179S）、アスパラギン残基（G179N）、又はアスパラギン酸残基（G179D）を保持するCGTase変異体。
位置180においてセリン残基（G180S）、アスパラギン残基（G180N）、又はアスパラギン酸残基（G180D）を保持するCGTase変異体。

位置185においてアルギニン残基（T185R）、グルタミン酸残基（T185E）、又はアスパラギン酸残基（T180D）を保持するCGTase変異体。
位置186においてアラニン残基を保持するCGTase変異体（T186A）。
位置193において野生型酵素のそれと異なる天然のアミノ酸残基を保持するCGTase変異体（N193X）。
位置193においてグリシン残基（N193G）、アラニン残基（N193A）、アスパラギン酸残基（N193D）、又はグルタミン酸残基（N193E）を保持するCGTase変異体。
位置195において野生型酵素のそれと異なる天然のアミノ酸残基を保持するCGTase変異体（Y195X）。
位置196において野生型酵素のそれと異なる天然のアミノ酸残基を保持するCGTase変異体（D196X）。
位置196においてアラニン残基（D196A）、セリン残基（D196S）、又はロイシン残基（D196L）を保持するCGTase変異体。
位置197においてアスパラギン残基（L197D）又はグルタミン酸残基（L197E）を保持するCGTase変異体。
位置232においてグルタミン残基（K232Q）、アスパラギン残基（K232N）、アラニン残基（K232A）、又はロイシン残基（K232L）を保持するCGTase変異体。
位置233においてグルタミン残基を保持するCGTase変異体（H233Q）。
位置264においてグルタミン残基（E264Q）、アラニン残基（E264A）、アスパラギン残基（E264N）、又はロイシン残基（E264L）を保持するCGTase変異体。
位置268においてアラニン残基を保持するCGTase変異体（E268A）。
位置371において野生型酵素のそれと異なる天然のアミノ酸残基を保持するCGTase変異体（D371X）。
位置371においてグリシン残基（D371G）、アスパラギン残基（D371N）、アラニン残基（D371A）、又はロイシン残基（D371L）を保持するCGTase変異体。
位置375において野生型酵素のそれと異なる天然のアミノ酸残基を保持するCGTase変異体（R375X）。
位置375においてプロリン残基（R375P）、グリシン残基（R375G）、グルタミン残基（R375Q）、アスパラギン残基（R375N）、アラニン残基（R375A）、又はロイシン残基（R375L）を保持するCGTase変異体。
位置599a（挿入）においてプロリン残基（*599aP）、アルギニン残基（*599aR）、又はヒスチジン残基（*599aH）を保持するCGTase変異体。
位置600において、異なる天然のアミノ酸残基、特にトリプトファン残基（L600W）、フェニルアラニン残基（L600F）、チロシン残基（L600Y）、アルギニン残基（L600R）、プロニン残基（L600P）、又はアスパラギン残基（L600N）に置換されたCGTase変異体。
位置616においてアラニン残基を保持するCGTase変異体（W616A）。
位置633においてアラニン残基を保持するCGTase変異体（W633A）。
位置662においてアラニン残基を保持するCGTase変異体（W662A）。
位置47にヒスチジン残基を、位置135にロイシン残基を保持するCGTase変異体（R47H／D135L）。
位置88にプロリン残基を、位置143にグリシン残基を保持するCGTase変異体（N88P／P143G）。
位置89にアスパラギン酸残基を、位置146にプロリン残基を保持するCGTase変異体（Y89D／S146P）。
位置89にグリシン残基を、位置193にグリシン残基を保持する（Y89G／N193G）。
位置92及び94が削除されているCGTase変異体（Ｖ92*／Ｎ94*）。
位置143にアラニン残基を、位置144にアルギニン残基を保持するCGTase変異体（P143A／A144R）。
位置143にグリシン残基を、位置144にアルギニン残基を、位置145にトリプトファン残基を保持するCGTase変異体（P143G／A144R／S145W）。

位置143にグリシン残基を、位置144にアルギニン残基を、位置145にトリプトファン残基を保持し（P143G／A144R／S145W）、そして位置179においてセリン残基（G179S）、アスパラギン残基（G179N）、又はアスパラギン酸残基（G179D）を保持するCGTase変異体。
位置143～148において、部分アミノ酸配列GRA**A、部分アミノ酸配列GRAAAA、部分アミノ酸配列GRAPAA、又は部分アミノ酸配列GRGPAAを含むCGTase変異体。
位置144にアルギニン残基を、位置145にアラニン残基を、位置146にプロリン残基を保持するCGTase変異体（A144R／S145A／S146P）。
位置145にアラニン残基を、位置145a（挿入）にイソロイシン残基を保持するCGTase変異体（S145A／*145aI）。
位置145にアラニン残基を保持し、位置146にグリシン残基を保持するCGTase変異体（S145A／S146G）。
位置145にロイシン残基を保持し、位置148にアスパラギン残基を保持するCGTase変異体（S145L／Q148N）。
位置145にグルタミン酸残基を、位置146にプロリン残基又はグルタミン残基を保持するCGTase変異体（S145E／S146P又はS145E／S146Q）。
位置145にトリプトファン残基を、位置146にトリプトファン残基、イソロイシン残基：又はアルギニン残基を保持するCGTase変異体（S145W／S146W，S145W／S146I又はS145W／S146R）。
位置145にアラニン残基を、位置145a（挿入）にイソロイシン残基を、位置148にグルタミン酸残基を保持するCGTase変異体（S145A／*145aI／Q148E）。
位置145a（挿入）にイソロイシン残基を、位置148にグルタミン酸残基を保持するCGTase変異体（*145aI／Q148E）。
位置148にグルタミン酸残基を、位置193にグルタミン残基を保持するCGTase変異体。
位置616にアラニン残基を、位置662にアラニン残基を保持するCGTase変異体（W616A／W662A）。
位置87～94において、部分アミノ酸配列IKYSGVNNを含み、及び／又は位置143～151において部分アミノ酸配列GRAGTNPGFを含むか、又は位置143～145において部分アミノ酸配列GRWを含むCGATase変異体。
位置87～94において部分アミノ酸配列HP* SGY**を含み、及び／又は位置143～151において部分アミノ酸配列PALETNPNFを含むか、又は位置143～151において部分アミノ酸配列PAAETWPAFを含むCGTase変異体。
位置87～94において部分アミノ酸配列HP* SGY**を含み、及び／又は位置143～151において部分アミノ酸配列PALETNPNFを含むか、又は位置143～151において部分アミノ酸配列PAAETWPAFを含み、そして位置195においてロイシン残基を保持する（Y195L）CGTase変異体。
位置87～94において部分アミノ酸配列HP* SGY**を含み、及び／又は位置143～151において部分アミノ酸配列PALETPNFを含むか、又は位置143～151において部分アミノ酸配列PAAEADPNFを含むCGTase変異体。
位置87～94において部分アミノ酸配列HP* SGY**を含み、及び／又は位置143～151において部分アミノ酸配列PALETNPNFを含むか、又は位置143～151において部分アミノ酸配列PAAEADPNFを含み、そして位置195においてロイシン残基を保持する（Y195W）CGTase変異体。
好ましくは、上述のCGTase変異体は、バチルスアウトリチクスの株、バチルス・セレウスの株、バチルスサーキュランスの株、バチルス・サーキュランス変種アルカロフィルスの株、バチルス・コアギュランスの株、バチルスフィルムスの株、バチルス・ハロフィルスの株、バチルス・マセランスの株、バチルス・メガテリウムの株、バチルスオーベンシスの株、バチルス・ステアロサーモフィルスの株、又はバチルス・サブチルスの株から得られる。
最も好ましくは、上述のCGTase変異体は、バチルス種株1011の株、バチルス種株38－２の株、バチルス種株17－１の株、バチルス種１－１の株、バチルス種株B1018の株、バチルス・サーキュランス株８の株もしくはバチルス・サーキュランス株251の株、又はそれらの突然変異体もしくは変異体から得られる。

更に他の好ましい実施形態において、本発明のCGTase変異体は、その酵素が以下の表13に示される位置に相当する１以上のアミノ酸位置における置換、挿入及び／又は欠失により改良されているサーモアナエロバクターの株から得られうる酵素から得られるCGTase変異体である。このような改良は、表に示すように、選択性の増加したCGTase変異体を導く。好ましくは、CGTase変異体はサーモアナエロバクター種ATCC 53627の株又はそれらの突然変異体もしくは変異体から得られる。

表13

生成物選択性の増加したサーモアナエロバクター由来CGTase変異体CGTaseナンバリングにより同定された位置

位置	α－シクロデキストリン	β－シクロデキストリン	γ－シクロデキストリン
21	F,Y	F,Y	F,Y
47	Q,L	A,Q,H,R,L	A,Q,H,R,L
87	I,H	I,H	I,H
88	N,K,H	N,K,H	N,K,H
89	G,A,Y,E,*	G,A,E,K,R,Y,P,*	G,A,Y,P,*
90	-	G,A	G,A
91	A,V,D,G	A,V,G,S	A,V,G,S
91a	A,V,G,Y,*	A,V,G,Y,*	A,V,G,Y,*
92	V,*	V,*	V,*
93	N,*	N,H,T,*	N,H,T,*
94	Q,K,R,W,F,N,*	Q,K,R,W,F,N,*	Q,K,R,W,F,N,*
98	-	G,A	G,A
101	-	G,A	G,A,F,Y
135	L	L	L
140	A,R,N	A,R,N	A,R,N
143	G,S	-	-
144	K,R,D,N,E,Q	-	-
145	A,E,W,P,G,F,Y,P,R,K	A,E,L,W	A,E,L,W
145a	P,A,F,Q,S,W,I,R,*	P,A,I,Q,S	I,A,Q,P,S
146	P,A,F,Q,S,W,I,R,G,*	P,A,I,Q,S,K,D,N,R,F,W,*	I,A,Q,P,S
147	A,L,I,F,*	A,L,I,F,W,G,Y,R,D,*	S,A,D
147a	*	*	D,N,E,Q,T
148	G,A,N	G,A,N,Q	E,R,K,Y,F,N,Q
149	-	W	L,I,F,W
150	A,G	A,S	A,S,N
167	P,F	A,F	A,F,P
168	S	S	S
178	N	N	N

179	S,N,D	S,N,D	S,N,D
180	S,N,D	S,N,D	S,N,D
183	W,Y,A	W,Y,A	W,Y,A
185	P,H,R,E,D	P,H,R,E,D	P,H,R,E,D
192	K	K	K
193	G,D,E,Q	G,A	G,A
195	Y	L,I,W,Y	L,I,W,Y
196	A,S,N,G	A,S,N,G	A,S,N,G
197	D,E	D,E	D,E
232	Q,L	Q,L	Q,L
233	Q,N,I	Q,N,I	Q,N,I
259	F,W,A	F,W,A	F,W,A
264	Q	Q	Q
326	Q,F,L	Q,F,L	Q,F,L
370	-	T,N	T,N
371	A,S,N,G,E,Q	A,G,N,S	A,G,N,V,L,I,S
373	D,N	D,E	D,E
375	-	A,P,G,K	A,P,G,K
600	X	X	X

X＝いずれかの天然のアミノ酸残基

- 保存性残基

* 欠失又は欠損残基

更に他の好ましい実施形態において、本発明のCGTase変異体は、その酵素が以下の表14に示される位置に相当する１以上のアミノ酸残基における置換、挿入及び／又は欠失により改良されているサーモアナエロバクターの株から得られうる酵素から得られるCGTase変異体である。このような改良は、生成物阻害の減少したCGTase変異体を導く。
好ましくは、CGTase変異体はサーモアナエロバクター種ATCC 53627の株又はそれらの突然変異体もしくは変異体から得られる。

表14

生成物阻害の減少したサーモアナエロバクター由来CGTase変異体

CGTaseナンバリングにより同定された位置	
47	A,Q,L
89	G
100	A,I,L,F
185	R,E,D
186	A
196	A,L
232	Q,N,A,L
264	A,N,L
268	A
339	A
371	G,N,A,L,S,E,Q
375	G,Q,N,A,L,K
382	A,L,V
384	A,L,V
413	A,V,G
598	A,V,G,P
599a	P,R,H
600	X
603	A,V,L,G
616	A,I,L,G
626	A,I,V,L,G
627	A,V,L,G
628	A,V,L,G
633	A,V,L,I,G
636	I,L,A,G
649	A,G
651	A,G,V
662	A,L,I,G
667	A

Ｘ＝いずれかの天然のアミノ酸残基

位置21においてフェニルアラニン残基（V21F）又はチロシン残基（V21Y）を保持するCGTase変異体。

位置47においてグルタミン残基（K47Q）、アラニン残基（K47A）、ロイシン残基（K47L）

、ヒスチジン残基（K47H）、又はアルギニン残基（K47R）を保持するCGTase変異体。
位置88においてリシン残基（P88K）を保持するCGTase変異体。
位置89においてアラニン残基（D89A）又はグリシン残基（D89G）を保持するCGTase変異体。
位置91においてアラニン残基（F91aA）又はチロシン残基（F91aY）を保持するか又は位置91ａが削除された（F91a*）CGTase変異体。
位置92が削除されたCGTase変異体（G92*）。
位置94においてグルタミン残基（S94Q）、リシン残基（S94K）、アルギニン残基（S94R）、トリプトファン残基（S94W）、もしくはフェニルアラニン残基（S94F）を保持するか又は位置94が削除された（S94*）CGTase変異体。
位置135においてロイシン残基（D135L）を保持するCGTase変異体。
位置143において野生型酵素のそれと異なる天然のアミノ酸残基（P143X）を保持するCGTase変異体。
位置143においてアラニン残基（P143A）を保持するかグリシン残基（P143G）を保持するCGTase変異体。
位置144において野生型酵素のそれと異なる天然のアミノ酸残基（A145X）を保持するCGTase変異体。
位置144においてアルギニン残基（A144R）、リシン残基（A144K）、又はアスパラギン酸残基（A144D）を保持するCGTase変異体。
位置145において野生型酵素と異なる天然のアミノ酸残基（S145X）を保持するCGTase変異体。
位置145においてアラニン残基（S145A）、グルタミン酸残基（S145E）、トリプトファン残基（S145W）、グリシン残基（S145G）、フェニルアラニン残基（S145Y）、チロシン残基（S145Y）、又はロイシン残基（S145L）を保持するCGTase変異体。
位置145a（挿入）において天然のアミノ酸残基（*145aX）を保持するCGTase変異体。
位置145a（挿入）においてイソロイシン残基（*145aZ）を保持するCGTase変異体。
位置146において野生型酵素のそれと異なる天然のアミノ酸残基（E146X）を保持するCGTase変異体。
位置146においてプロリン残基（E146P）、セリン残基（E146S）、イソロイシン残基（E146I）、グルタミン残基（E146Q）、トリプトファン残基（E146W）、又はアルギニン残基（E146R）を保持するCGTase変異体。
位置147において野生型酵素のそれと異なる天然のアミノ酸残基を保持するCGTase変異体（T147X）。
位置147においてイソロイシン残基（T147I）、ロイシン残基（T147L）、アラニン残基（T147A）、セリン残基（T147S）、又はトリプトファン残基（T147W）を保持するCGTase変異体。
位置147a（挿入）において天然のアミノ酸残基（*147aX）を保持するCGTase変異体。
位置147a（挿入）においてアラニン残基（*147aA）を保持するCGTase変異体。
位置148において野生型酵素のそれと異なる天然のアミノ酸残基（D148X）を保持するCGTase変異体。
位置148においてアラニン残基（D148A）、グリシン残基（D148G）、グルタミン酸残基（D148E）、又はアスパラギン酸残基（D148N）を保持するCGTase変異体。
位置149において野生型酵素のそれと異なる天然のアミノ酸残基を保持するCGTase変異体（P149X）。
位置149においてイソロイシン残基（P149I）を保持するCGTase変異体。
位置167においてフェニルアラニン残基（Y167F）を保持するCGTase変異体。
位置179においてセリン残基（G179S）、アスパラギン残基（G179N）、又はアスパラギン酸残基（G179D）を保持するCGTase変異体。
位置180においてセリン残基（G180S）、アスパラギン残基（G180N）、又はアスパラギン酸残基（G180D）を保持するCGTase変異体。

位置185においてアルギニン残基（S185R）、グルタミン酸残基（S185E）、アスパラギン酸残基（S185D）を保持するCGTase変異体。
位置186においてアラニン残基（Y186A）を保持するCGTase変異体。
位置193において野生型酵素のそれと異なる天然のアミノ酸残基（N193X）を保持するCGTase変異体。
位置193においてグリシン残基（N193G）、アラニン残基（N193A）、アスパラギン酸残基（N193D）、又はグルタミン酸残基（N193E）を保持するCGTase変異体。
位置195において野生型酵素のそれと異なる天然のアミノ酸（F195X）を保持するCGTase変異体。
位置196において野生型酵素のそれと異なる天然のアミノ酸残基（D196X）を保持するCGTase変異体。
位置196においてアラニン残基（D196A）、セリン残基（D196S）、又はロイシン残基（D196L）を保持するCGTase変異体。
位置197においてアスパラギン酸残基（L197D）又はグルタミン酸残基（L197E）を保持するCGTase変異体。
位置232においてグルタミン酸残基（K232Q）、アスパラギン酸残基（K232N）、アラニン残基（K232A）、又はロイシン残基（K232L）を保持するCGTase変異体。
位置233においてグルタミン酸残基（H233Q）を保持するCGTase変異体。
位置259においてフェニルアラニン残基（Y259F）を保持するCGTase変異体。
位置264においてグルタミン残基（E264Q）、アラニン残基（E264A）、アスパラギン残基（E264N）、又はロイシン残基（E264L）を保持するCGTase変異体。
位置268においてアラニン残基（N268A）を保持するCGTase変異体。
位置371において野生型酵素のそれと異なる天然のアミノ酸（D371X）を保持するCGTase変異体。
位置371においてグリシン残基（D371G）、アスパラギン残基（D371N）、アラニン残基（D371A）、ロイシン残基（D371L）、又はグルタミン酸残基（D371E）を保持するCGTase変異体。
位置375において野生型酵素のそれと異なる天然のアミノ酸残基（R375X）を保持するCGTase変異体。
位置375においてプロリン残基（R375P）、グリシン残基（R375G）、グルタミン残基（R375Q）、アスパラギン残基（R375N）、アラニン残基（R375A）、又はロイシン残基（R375L）を保持するCGTase変異体。
位置599a（挿入）においてプロリン残基（*599aP）アルギニン残基（*599aR）、又はヒスチジン残基（*599aH）を保持するCGTase変異体。
変異体位置600が異なるアミノ酸残基、特にフェニルアラニン残基（W600F）、チロシン残基（W600Y）、アルギニン残基（W600R）、プロリン残基（W600P）、ロイシン残基（W600L）、又はアスパラギン残基（W600N）で置換されたCGTase変異体。
位置616においてアラニン残基（W616A）を保持するCGTase変異体。
位置633においてアラニン残基（Y633A）を保持するCGTase変異体。
位置662においてアラニン残基（W662A）を保持するCGTase変異体。
位置47においてヒスチジン残基又はアルギニン残基を、及び／又は位置135においてロイシン残基（K47H／D135L又はK47R／D135L）を保持するCGTase変異体。
位置87～94において部分アミノ酸配列IKYSGVNN又は部分アミノ酸配列INDSGVNNを、及び／又は位置143～151において部分アミノ酸配列GRAGTNPGFを、又は位置143～145において部分アミノ酸配列GRWを含み、又は位置195においてチロシン残基（F195Y）を保持するCGTase変異体。
位置87～94に部分アミノ酸配列INDSGVNNを、及び／又は位置146～150において部分アミノ酸配列SDQPSを含むCGTase変異体。
位置87～94に部分アミノ酸配列HP* SGY**を、及び／又は位置143～151に部分アミノ酸配列PALETNPNFを、又は位置143～151に部分アミノ酸配列PAAETWPAFを含むCGTase変異体。

位置87～94に部分アミノ酸配列HP* SGY**を、及び／又は位置143～151に部分アミノ酸配列PALETNPNFを、又は位置143～151に部分アミノ酸配列PAAETWPAFを含み、位置195にロイシン残基（F195L）を保持するCGTase変異体。
位置87～94に部分アミノ酸配列HP* SGY**を、及び／又は位置143～151に部分アミノ酸配列PALETNPNFを、又は位置143～151に部分アミノ酸配列PAAEADPNFを含むCGTase変異体。
位置87～94に部分アミノ酸配列HP* SGY**を、及び／又は位置143～151に部分アミノ酸配列PALETNPNFを、又は位置143～151に部分アミノ酸配列PAAEADPNFを含み、位置195にロイシン残基（F195W）を保持するCGTase変異体。
位置92及び94が削除されているCGTase変異体（Ｃ92*／Ｓ94*）。
位置143にアラニン残基を保持し、位置144にアルギニン残基を保持するCGTase変異体（P143A／A144R）。
位置143にグリシン残基を、位置144にアルギニン残基を、位置145にトリプトファン残基（P143G／A144R／S145W）を保持するCGTase変異体。
位置143にグリシン残基を、位置144にアルギニン残基を、位置145にトリプトファン残基を保持し（P143G／A144R／S145W）、そして位置179にセリン残基（G179S）、アスパラギン残基（G179N）、又はアスパラギン酸残基（G179D）を、及び／又は位置180にアスパラギン残基（G180N）又はアスパラギン酸残基（G180D）を保持するCGTase変異体。
位置143～148において、部分アミノ酸配列GRA**A、部分アミノ酸配列GRAAAA、部分アミノ酸配列GRPAAA、部分アミノ酸配列GRAPAA、又は部分アミノ酸配列GRGPAAを含むCGTase変異体。
位置143～151に部分アミノ酸配列GRAGTNPGを含むCGTase変異体。
位置143～151に部分アミノ酸配列GRAGTNPGを含み、位置195にチロシン残基（F195Y）を保持するCGTase変異体。
位置144にアルギニン残基を、位置145にアラニン残基を、位置146にプロリン残基（A144R／S145A／E146P）を保持するCGTase変異体。
位置145にアラニン残基を、位置145a（挿入）にイソロイシン残基（S145A／*145aI）を保持するCGTase変異体。
位置145にアラニン残基を、位置146にグリシン残基（S145A／E146G）を保持するCGTase変異体。
位置145にロイシン残基を、位置148にアスパラギン残基（S145L／D148N）を保持するCGTase変異体。
位置145にグルタミン酸残基を、位置146にプロリン残基又はグルタミン残基（S145E／E146P又はS145E／E146Q）を保持するCGTase変異体。
位置145にトリプトファン残基を、位置146にトリプトファン残基、イソロイシン残基、又はアルギニン残基（S145W／E146W, S145W／E146I又はS145W／E146R）を保持するCGTase変異体。
位置145にアラニン残基を、位置145a（挿入）にイソロイシン残基を、位置148にグルタミン酸残基（S145A／*145aI／D148E）を保持するCGTase変異体。
位置145a（挿入）にイソロイシン残基を、位置148にグルタミン酸残基（*145aI／D148E）を保持するCGTase変異体。
位置616にアラニン残基を、位置662にアラニン残基（W616A／W662A）を保持するCGTase変異体。

CGTase変異体を生産する方法

本発明のCGTase変異体の生産は、Sambrookら［Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T；Molecular Cloning；A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, New York］により記載され、当業者に周知であるような組換えDNA技術の一般的な原理に従う。
形式的には、生産は本発明のCGTase変異体をコードするDNA構成物を用意して行われる。

DNA構成物

他の態様において、本発明は、本発明のCGTase変異体をコードするDNA構成物を提供する

。本明細書に定義する場合、“DNA構成物”は、cDNA、ゲノムDNA、合成DNA又はRNA源のいずれをも含むことを意図する。“構成物”という用語は、一本鎖又は二本鎖であり得、関心のCGTase変異体をコードする完全な又は部分的に天然のヌクレオチド配列に基づき得る核酸セグメントを示すことを意図する。その構成物は必要に応じて他の核酸セグメントを含み得る。

本発明のDNA構成物は、前駆体CGTaseをコードするDNA配列を適切に改良することにより調製することができる。その改良は、次のことをもたらし得る：

（ｉ）アミノ酸配列中の１又は複数の異なる部位における１又は複数のアミノ酸残基の導入；及び／又は

（ii）アミノ酸配列中の１又は複数の異なる部位における１又は複数のアミノ酸残基の置換；及び／又は

（iii）アミノ酸配列中の１又は複数の部位における１又は複数のアミノ酸残基の欠失。

DNA配列の改良は、例えばSambrookら（前掲）に記載されるような公知の手順に従って、部位特異的変異誘発もしくはランダム変異誘発、又はこれらの技術の組み合わせにより行うことができる。

より好ましい実施形態において、本発明のDNA構成物は、以下の実施例に記載される１又は複数の部分的なオリゴヌクレオチド配列（プライマー）を含む、これらの部分的オリゴヌクレオチド配列は特に、

5'-G GTC GTT TAC CAG GCG CCG AAC TGG-3'(Y633A);

5'-GC GAG CTC GGG AAC GCG GAC CCG-3'(W616A:);

5'-CC GTC ACC GCG GAA GGC GGC-3'(W662A);

5'-GC ATC TAC AAG GGC CTG TACGAT CTC G-3'(N193G);

5'-GCA TCA TCA ATG GAT CCG GCG TAA AC-3'(Y89G);

5'-CAT ACG TCG CCC GCT AGC ATT TCC GAC CAG CCT TCC-3'(145a I);

5'-CG GGC GGG ACC GGT CCG GAC AAC CG-3'(D371G);

5'-G TCG GGC GGT ACC AAT CCG GAC AAC C-3'(D371N);

5'-CG TTC ATC GAT CAG CAT GAC ATG G-3'(N326Q);

5'-GC ATC ATC AAT GAT TCC GGA GTA AAC AAC ACG GC-3'(Y89D);

及び

5'-G CCC GCC TCT CCG GAC CAG CCT TC-3'(S146P);

並びに実施例５，６及び７のプライマーＡ１－Ａ24、プライマーＢ１－Ｂ15、及びプライマーＣ１－Ｃ９に記載されるような部分的オリゴヌクレオチド配列（プライマー）である。

発現ベクター

改良の後、CGTase変異体は、本発明のCGTase変異体をコードするDNA構成物を、適切なベクター内の適切な発現シグナルと組み合わせることにより、得ることができる。

本発明の発現ベクターは、便利には組換えDNA手順が行われるいずれかの発現ベクターであり得、ベクターの選択は、しばしばそれが導入される宿主細胞による。これにより、ベクターは、自己複製ベクター、即ちその複製が染色体の複製と独立している染色体外存在

物として存在するベクター、例えばプラスミドであり得る。あるいは、ベクターに、宿主細胞に導入した時に宿主細胞ゲノム内に一体化して、それが一体化されている染色体と共に複製され得るものであり得る。
本発明の発現ベクターにおいては、CGTase変異体をコードするDNA配列は、DNAの転写に必要とされる更なるセグメントに作用的に連結される。一般に、発現ベクターは、プラスミドもしくはウイルスDNAから得られるが、又は両方の要素を含み得る。“作用的に連結”とは、セグメントがそれらの意図される目的と合わせて機能するように、例えば転写がプロモーターにおいて始まり、CGTase変異体をコードするDNA配列を通して進むように配置されることを示す。
これにより、本発明の発現ベクターにおいて、CGTase変異体をコードするDNA配列は、好ましくは適切なプロモーター及びターミネーター配列に作用的に連結されるはずである。プロモーターは、選択された宿主細胞中で転写活性を示すいずれかのDNA配列であり得、宿主細胞に対して同種又は異種のいずれかのタンパク質をコードする遺伝子から得ることができる。CGTase変異体、プロモーター及びターミネーターをコードするDNA配列を各々連結し、そしてそれらを適切なベクター内に挿入するのに用いられる手順は当業者に公知である（例えばSambrookら、前掲）。
プロモーターは、選択された宿主細胞中で転写活性を示すいずれかのDNA配列であり得、宿主細胞に対して同種又は異種のいずれかのタンパク質をコードする遺伝子から得られうる。
バクテリア宿主細胞中で本発明のCGTase変異体をコードするDNAの転写を行うための適切なプロモーターの例は、バチルスステアロサーモフィルス（Bacillus stereothermophilus）マルトジェニックアミラーゼ遺伝子、バチルス・リケニホルムス（Bacillus licheniforms）α－アミラーゼ遺伝子、バチルス・アミロリクエファシエンス（Bacillus amyloliquefaciens）BANアミラーゼ遺伝子、バチルス・サブチルスアルカリプロテアーゼ遺伝子、又はバチルス・プミルス（Bacillus pumilus）キシラーゼもしくはキシロシダーゼ遺伝子のプロモーター、又はλファージP_RもしくはP_Lプロモーターもしくは大腸菌lac，trpもしくはTacプロモーターを含む。
イースト宿主細胞に用いるための適切なプロモーターの例は、イースト解糖遺伝子［Hitzemanら、J. Biol. Chem. 1980 255 12073-12080；Alber及びKawasaki，J. Mol. Appl. Gen. 1982 1419-434］アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子［Youngら、in Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals（Hollaender et al，Eds.），Plenum Press，New York，1982］、からのプロモーター又はthe TPI１［US 4,599,311］もしくはADH２－４c［Russellら、Nature 1983 304 652-654］プロモーターを含む。
糸状菌宿主細胞に用いるための適切なプロモーターの例は、例えば、ADH３プロモーター［McKnightら、EMBO. J 1985（4）2093-2099］又はtpiAプロモーターである。他の有用なプロモーターの例は、A．オリザエ（A. oryzae）TAKAアミラーゼ、リゾムコール・ミエヘイ（Rhizomucor miehei）アスパラギン酸プロテイナーゼ、A．ニゲル（A. niger）中性のα－アミラーゼ、A．ニゲル酸安定α－アミラーゼ、A．ニゲルもしくはA．アワモリ（A. awamori）グルコアミラーゼ（gluA）、リゾムモール・ミエヘイリパーゼ、A．オリザエアルカリプロテアーゼ、A．オリザエトリオースホスフェートイソメラーゼ又はA．ニジュランス（A. nidulans）アセトアミダーゼから得られるものである。好ましいのはTAKAアミラーゼ及びgluAプロモーターである。
本発明の発現ベクターは、ベクターが問題の宿主細胞中で複製するのを可能にするDNA配列を更に含み得る。発現ベクターは、選択マーカー、例えばその産物が宿主中の欠損を補う遺伝子、例えばジヒドロホレートレダクターゼ（DHFR）をコードする遺伝子もしくはスキゾサッカロマイセス・ボンベ（Schizosaccharomyces pombe）TPI遺伝子［Russell PR；Gene 1985（40）125-130）又は薬剤、例えばアンピシリン、カナマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ネオマイシン、ヒグロマイシン又はメトトレキセートに対する耐性を供するものも含み得る。糸状菌のために、選択マーカーは、amdS，pyrG，argB，niaD及びsCを含む。

CGTaseを宿主細胞の分泌経路に方向づけるために、（リーダー配列、プレプロ配列又はプレ配列としても知られる）分泌シグナル配列が発現ベクター内に供され得る。分泌シグナル配列は、正確な読み枠内でCGTaseをコードするDNA配列に連結される。分泌シグナル配列は、一般にCGTase変異体をコードするDNA配列に対して５’に位置する。分泌シグナル配列は、通常CGTaseに関連し、又は他の分泌タンパク質をコードする遺伝子からのものであり得る。

好ましい実施形態において、本発明の発現ベクターは、例えばWO86/05812に記載されるようなバチルス・リケニホルミスα－アミラーゼ遺伝子の分泌シグナルコード化配列と実質的に同一な分泌シグナル配列を含み得る。

また、例えばUS 4,959,316又はWO91/09129に記載されるように、例えば一本鎖もしくは二本鎖クロスオーバーに関するタンデム増幅技術又はマルチコピー技術により、発現の増幅についての測定を行うことができる。あるいは、発現ベクターは、例えばEP 283,075に記載されるように複製の温度センシティブ源を含み得る。

CGTase変異体をコードするDNA配列、プロモーター並びに必要に応じてターミネーター及び／又は分泌シグナル配列を連結し、それらを複製に必要な情報を含む適切なベクター内に挿入する手順は当業者に公知である（例えばSambrookら、前掲）。

宿主細胞

更に他の態様において、本発明は、本発明のDNA構成物及び／又は本発明の組換え発現ベクターを含む宿主細胞を提供する。

本発明のDNA構成物又は組換え発現ベクターが導入されるべき本発明の宿主細胞は、CGTase変異体を生産することができるいずれかの細胞、好ましくは非病原性細胞であり得、バクテリア、イースト、真菌及び高等な真核細胞を含む。

培養に基づいて本発明のCGTase変異体を生産することができるバクテリア宿主細胞の例は、グラム陽性バクテリア、例えばバチルスの株、特にＢ．サブチルス、Ｂ．リケニホルミス、Ｂ．レントゥス（B. lentus）、Ｂ．ブレビス（B. brevis）、Ｂ．ステアロサーモフィルス、Ｂ．アルカロフィルス（B. alkalophilus）、Ｂ．アミロリクエファシエンス、Ｂ．コアギュランス、Ｂ．サーキュランス、Ｂ．ラウトゥス（B. lautus）、Ｂ．メガテリウム（B. megatherium）、Ｂ．プミルス（B. pumilus）、Ｂ．トウリンギエンシス（B. thuringiensis）もしくはＢ．アガラドヘレンス（B. agaradherens）の株、又はストレプトマイセス（Streptomyces）の株、特にＳ．リビダンズ（S. lividans）もしくはＳ．ムリヌス（S. murinus）の株、又はグラム陰性バクテリア、例えば大腸菌である。バクテリアの形質転換体は、それ自体周知である方法で、プロトプラスト形質転換により又はコンピテント細胞を用いることにより行うことができる。

大腸菌のようなバクテリア内でCGTase変異体を発現する場合、CGTaseは細胞質内に、典型的には（封入体として知られる）不溶性粒子として保持され得、又はバクテリアの分泌配列により細胞周辺腔に向けられ得る。前者の場合、細胞が溶解され、粒子が回収されて変性された後、変性剤を希釈することにより再び折りたたまれる。後者の場合、CGTaseは、細胞周辺腔の成分を放出するために、例えば音波処理又は浸透性ショックにより細胞を破壊し、CGTase変異体を回収することにより、細胞周辺腔から回収することができる。

適切なイースト細胞の例は、サッカロマイセス種又はスキゾサッカロマイセス種、特にサッカロマイセス・セレビシアエ（Saccharomyces cerevisiae）又はサッカロマイセス・クルイベリ（Saccharonyces kluyveri）の株の細胞を含む。異種DNAでイースト細胞を形質転換し、それから異種ポリペプチドを産生する方法は、例えば引用により本明細書に組み込まれるUS 4,599,311, US 4,931,373, US 4,870,008, US 5,037,743、及びUS 4,845,075に記載される。形質転換された細胞は、選択マーカー、一般に薬剤耐性又は特定の栄養素、例えばロイシンの欠如下で増殖する能力により決定された表現型により選択される。イーストに用いるための好ましいベクターは、US 4,931,373に開示されるPOT１ベクターである。本発明のCGTase変異体をコードするDNA配列は、例えば上述のように、その上流にシグナル配列及び必要に応じてリーダー配列を有し得る。適切なイースト細胞の更なる例は、クルイベロマイセス（Kluyveromyces）、例えばＫ．ラクチス（Klactis）、ハンセヌ

ラ（Hansenula）、例えばH．ポリモルファ（H. polymorpha）、又はピキア（Pichia）、例えばP．ポストリス（P. postoris）の株である［Gleesonら、J. Gen. Mscrobiol. 1986（132）3459-3465；US 4,882,279］。
他の真菌の例は、糸状菌の細胞、例えばアスペルギルス種（Aspergillus spp.）、ニューロスポーラ種（Neurospora spp.）、フサリウム種（Fusarium spp.）、又はトリコデルマ種（Thichoderma spp.）、特にA．オリザエ、A．ニジュランス又はA．ニゲルの株である。タンパク質の発現のためのアスペルギルス種の使用は、例えばEP 272,277及びEP 230,023に記載されている。F．オキシスポルムの形質転換は、例えばMalardierら（Gene 1989（78）147-156）に記載されるように行うことができる。
上述の形質転換又は移入された宿主細胞は、次にCGTaseの発現を許容し、その後CGTase変異体がその培地から回収されるのを許容する条件下で適切な栄養培地中で培養される。
細胞を培養するのに用いられる培地は、適切な補足物を含む最小又は複合培地のような宿主細胞を増殖させるのに適したいずれかの慣用の培地であり得る。適切な培地は商業的供給元から利用でも、又は出版されている処方（例えばAmerican Type Culture Collectionのカタログ）に従って調製することができる。次に、細胞により生産されるCGTase変異体は慣用的手順により培養培地から回収され得る。その手順は、問題のCGTaseのタイプにより、遠心又はろ過により培地から宿主細胞を分離し、塩、例えば硫酸アンモニウムにより上清又はろ液のタンパク質構成物を沈殿させ、種々のクロマトグラフィー手順、例えばイオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、又はアフィニティークロマトグラフィー等により精製することを含む。

CGTase変異体の製法

更に他の態様において、本発明は、本発明のCGTase変異体を生産する方法であって、CGTaseをコードするDNA配列で形質転換されている適切な宿主細胞を、酵素の生産を許容する条件下で培養し、生じた酵素をその培地から回収することを特徴とする方法を提供する。
形質転換された宿主細胞を培養するのに用いる培地は問題の宿主細胞を増殖させるのに適したいずれかの慣用的な培地であり得る。発現されたCGTaseは便利には培養培地中に分泌され得、そして公知の手順によりそれから回収され得る。その手順は、遠心又はろ過により培地から細胞を分離し、硫酸アンモニウムのような塩により培地のタンパク質構成物を沈殿させ、次にイオン交換クロマトグラフィー又はアフィニティークロマトグラフィー等のようなクロマトグラフィー手順を行うことを含む。

工業上の適用

本発明のCGTaseは、種々の工業的適用、特に食品、化粧品、化学、農薬及び医薬工業において、シクロデキストリンを製造するための方法に適用することができる。
それゆえ、他の態様において、本発明は、シクロデキストリン、特にα－，β－，γ－，δ，ε－、及び／又はζ－シクロデキストリンを製造するための方法に用いるためのCGTaseを提供する。より好ましい実施形態において、本発明は、α－，β－及びγ－シクロデキストリン、又はそれらの混合物の製造のための方法に用いるためのCGTase変異体を提供する。他の好ましい実施形態において、本発明は、δ，ε－、及びζ－シクロデキストリン、又はそれらの混合物を製造するために用いるためのCGTase変異体を提供する。
本発明のCGTase変異体は、直鎖オリゴサッカリド、特に２～12グルコース単位の直鎖オリゴサッカリド、好ましくは２～９グルコース単位の直鎖オリゴサッカリドの製造のための方法にも用いることができる。
更に他の好ましい実施形態において、本発明のCGTase変異体は、シクロデキストリンのイン・シトゥ形成のために用いることができる。この方法において、本発明のCGTase変異体はその酵素変異体が要求されるシクロデキストリンを形成することができる培地を含む基質に添加することができる。この適用は、焼いたものを製造する方法、化学製品を安定化するための方法においてそれらの製造の間、及び界面活性組成物において行われるのに特によく適している。
特定のシクロデキストリンは、焼いたもの（baked product）の質を改良することが知られている。それゆえ本発明のCGTase変異体はパン改質添加物、例えば生地組成物、生地添

加物、生地コンディショナー、プレミックス、並びにパンもしくは焼いたものを作るための過程の間に穀粉及び／又は生地に添加するのに便利に用いられる同様の調製物への適用に用いることができる。
シクロデキストリンは、安定性、可溶性等に役立つ包接能力を有する。これにより、シクロデキストリンは、酸化性及び光分解性物質を安定に、揮発性物質を非揮発性に、不十分にしか溶けない物質を可溶性に、そして芳香性物質を非芳香性にするなどのことを行うことができ、これにより香料、ビタミン、染料、医薬品、農薬及び殺真菌剤を被包するのに役立つ。シクロデキストリンは、コレステロールのような疎水性物質に結合して卵黄、バター等から、それらを除去することもできる。
シクロデキストリンは、プラスチック積層体、フィルム、膜等において種々の目的のために用いられているプラスチック及びゴムに関する製品及び過程に利用することもできる。また、シクロデキストリンは、生分解性プラスチックの製造のためにも用いられている。
実施例
本発明は、以下の実施例を参照して更に詳細に説明されるが、これらは請求される本発明の範囲を限定するいずれの方法でもない。
実施例１
CGTase酵素の結晶構造及び分子モデル化
バチルス・サーキュランス株251［Lawson C L, van Montfort R, Strokopytov B, Rozeboom H J, Kalk K H, de Vries G E, Penninga D, Dijkhuizen L、及びDijkstra B W, J. Mol. Biol. 1994（236）590-600］を非加水分解性テトラサッカリドアカルボースを含む緩衝液中に浸漬して、触媒部位に位置した凝－テトラサッカリドを含むCGTaseのＸ線構造を得た（Strokopytovら［Strokopytov B, Penninga D, Rozeboom H J；Kalk K H, Dijkhuizen L及びDijkstra B W, Biochemistry 1995（34）2234-2240］。この構造の配置はエントリーコード1CXGでProtein Data Bank（Biology Department, Bldg. 463, Brookhaven National Laboratory, P. O. Box 5000, Upton, NY 11973-5000, USA）に寄託されている。
マルトヘプタオースを含む緩衝液中に更に浸漬することにより、酵素－基質複合体構造中にノナサッカリド（Ａ－１）を形成した。この構造の配置は、エントリーコード1DIJでProtein Data Bank（Biology Department, Bldg. 463, Brookhaven National Laboratory, P. O. Box 5000, Upton, NY 11973-5000, USA）に寄託されている。コンピューターモデル化によりノナサッカリドの非還元端にトリサッカリド（Ｊ－Ｌ）を更に加えることにより、Ａ及びＢドメインにおける基質結合クレフト及びそれに関連する残基を位置決定した。
サブセット－ゾーン関数を用いるコンピュータープログラムInsight™ソフトウェアーパッケージ（Biosym）により、選択された距離内の位置を同定することができた。この方法で表１～４を作った。
図１に列記される残基は、バチルス・サーキュランス株251 CGTaseを示し、基質と酵素との間の最も近い接触のみを含む。酵素と基質との間の水素結合及び他の相互作用の数を変えることにより、生成物選択性を変えることができる。通常、デンプンの開裂は、モデルのグルコース単位ＢとＣとの間でおこる。
コンピューターモデル化により、アカルボース（Ａ）の還元端に、及びＥ－ドメインに位置したペンタサッカリドの非還元端によりサッカリドを加え、これによりＡ－Ｂ及びＥ－ドメイン中の基質結合部位に一緒に結合させた。全体として、20グルコース単位の基質が酵素内に位置した。
サーモアナエロバクターCGTaseの構造を、バチルス・サーキュランスCGTaseの周知の構造に基づいてモデル化した。製造元の説明書に従ってホモロジーモジュールを用いて、再びコンピュータープログラムBiosymからのInsight™を用いた。バチルス・サーキュランスに見い出された基質は、サーモアナエロバクターモデルに合体され、表５～７に示す位置が同定された。
実施例２
バチルスからのα－シクロデキストリン産生性CGTase変異体の作製

本実施例は、部位特異的変異誘発が活性部位クレフトのサブ部位中の水素結合の数を変えるものである３つのα－シクロデキストリン産生性CGTase変異体を記載する。その変異体は、Lawsonら［Lawson C L, van Montfort R, Strokopytov B, Rozeboom H J, Kalk K H, de Vries G E, Penninga D, Dijkhuizen L、及びDijkstra B W, J. Mol. Biol. 1994 236 590-600］により記載されるように得られたバチルス・サーキュランス株251 CGTase（即ち野生型酵素）から得られる。

変異体の作製のための方法は部位特異的変異誘発のためのPCRに基づく。変異体を作るのに以下のオリゴヌクレオチド（プライマー）を用いた。

Y89G : 5'-GCA TCA TCA ATG GAT CCG GCG TAA AC-3' (Bam HI)

;及び

S146P : 5'-G CCC GCC TCT CCG GAC CAG CCT TC-3' (BspE I)。

成功した変異誘発は、下線の制限部位に表れ、潜在的な変異体の迅速なスクリーニングを許容した。

制限分析及び配列決定により変異体を確認した。変異体タンパク質をアミラーゼ及びプロテアーゼ陰性バチルス・サブチルス株を用いることにより生産し、アフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。

CGTase活性を、50℃で５～10分、10mMクエン酸ナトリウム、pH6.0中に基質と共に適切に希釈された酵素溶液をインキュベートすることにより決定した。

シクロデキストリン形成活性（トランスグリコシル化活性）を、基質として５％Paselli™ SA2（即ちAVEBE, Foxhol, The Netherlandsから利用できる50の平均重合度の部分的に加水分解されたポテト）を用いて測定した。形成されたβ－シクロデキストリンを、フェノールフタレインで測定した。活性の１単位を、分当りに１μmolのβ－シクロデキストリンを生産することができる酵素の量として定義される。次にα－及びβ－シクロデキストリン形成を、HPLC（以下）を用いることにより測定した。

シクロデキストリン形成を工業生産過程条件下でも測定した。この目的のために、0.1U／mlのCGTaseを、45時間、50℃で10mMクエン酸緩衝液（pH6.0）中で10％Paselli™ WA4（即ちジェット－クック（jet－cooked）プレゼラチン化ドラム－乾燥デンプン）とインキュベートした。サンプルを規則的な時間間隔で収集し、５分間、沸騰して、その生成物を分当り１mlの流速でアセトニトリル／水（60／40％　ｖ／ｖ）で溶出する25cm Econsosil－$NH_2$10ミクロンカラム（Alltech Associates Inc., USA）を用いてHPLCにより分析した。

結　果

α－シクロデキストリン形成を増加させるために変異体をデザインした。第１の実験において、位置89のチロシン残基を、基質のサブ部位Ｆとの更なる水素結合を導く（図１）アスパラギン酸残基（Y89D）に変えた。これは、より小さいシクロデキストリンの形成と共に活性部位クレフト中にアミラーゼ鎖のより強い結合を生じさせる。結果として、α－シクロデキストリン形成活性の増加が、β－シクロデキストリン形成活性の減少と同時に検出され、それはPaselli™から生産されたシクロデキストリンの比率（表16）及びシクロデキストリン形成プロファイル（図２Ｂ）から見られる。

第２の実験において、位置146のセリンをプロリン残基に変えた（S146P）。これは、基質のサブ部位Ｉ（図１）における水素ネットワークの劇的な変化を生じた。以下の表15から見られるように、この変異は、シクロデキストリン形成活性に実質的な影響力を有する。α－シクロデキストリン形成活性は、β－シクロデキストリン形成活性の損失において劇的に増加した。γ－シクロデキストリン形成活性にはほとんど効果がなかった。これは、表16及び図２Ｃにおいて決定され、それに供されたシクロデキストリンの比にも対応する。

第３の実験において、二重変異を行った。この実験において、位置89のチロシンをアスパラギン酸残基に変え、位置146のセリンをプロリン残基に変えた（Y89D／S146P）。これら

の変異は、上述のように行われた２つの単一変異から見られる結果の組み合わせを生じた。この変異体は、最も大きなα－シクロデキストリン形成活性（表15）、及び最も大きいα－シクロデキストリンの形成（表16及び図２Ｄ）を有する。

表15

α－，β－，γ－CD形成性CGTaseの特異活性

酵　素	環化活性（U／mg）		
	α	β	γ
野生型	2	280	80
Y89D	5	270	47
S146P	25	104	82
Y89D／S146P	35	109	79

表16

10% Paselli™ WA4からのシクロデキストリン形成の比率（50℃，50時間）

酵　素	生産されたシクロデキストリン（%）		
	α	β	γ
野生型	14	63	23
Y89D	17	63	20
S146P	26	55	19
Y89D／S146P	31	51	18

実施例３

バチルスCGTaseのＥドメインにおける変異

本実施例は、Ｅドメインクレフトにおいて変異を保持する２つのCGTase変異体の作製を記載する。その変異体は、Lawsonら［Lawson C L, van Montfort R, Strokopytov B, Rozeboom H J, Kalk K H, de Vries G E, Penninga D, Dijkhuizen L、及びDijkstra B W, J. Mol. Biol. 1994 236 590-600］により記載されるように得られるバチルス・サーキュランス株251 CGTase（即ち野生型酵素）から得られる。

Ｅドメイン中に２つのマルトース結合部位（MBS）を同定し、本実験においてこれらの部位が酵素の生デンプン結合特性について特に重要であることが見い出された。第１の部位（MBS1）は、基質のグルコース環とのそれらのインドール基のファン・デル・ワールス接触を介してマルトースに結合する位置616及び662におけるトリプトファンを含む。第２の

部位（MBS2）、ほとんどの場合位置633における保存性チロシンは基質のグルコース残基とのファン・デル・ワールス接触を形成する。周囲の残基との水素結合は、これらの部位における結合を増強させる。MBS2は、活性部位に導く溝近くに位置する。

VENT－DNAポリメラーゼを用いる２つのPCR反応に基づく方法により変異を導入した。各々の変異のために、特定のオリゴヌクレオチドを開発した。制限分析及び配列決定により変異を確認した。アミラーゼ及びプロテアーゼ陰性バチルス・サブチルス株から変異体を得て、アフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。

バクテリア株及びプラスミド：大腸菌MC1061［Meissner P S, Sisk W P, Berman M L；Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1987（84）4171-4175］を、組換えDNA操作及び部位特異的変異誘発のために用いた。大腸菌DH５α［Hanahan D；J. Mol. Biol 1983（166）557］を配列決定のためのモノマースーパーコイルプラスミドの生産のために用いた。CGTase変異体をα－アミラーゼ及びプロテアーゼ陰性バチルス・サブチルス株DB104A［Smith H, de Jong A, Bron S, Venema G；Gene 1988（70）351-361］で生産した。カナマイシン耐性マーカーを含むフラグメントを、HindIII及びXba Ｉで消化されたバチルスサーキュランスCGTase（クレノウポリメラーゼで平滑化されたもの）を含むプラスミドpDP66S［Penninga D, Strokopytov. B, Rozeboom H J, Lawson C L, Dijkstra B W, Bergsma J, Dijikhwizen L；Biochemistry 1995（34）3368-3376］からその最も大きいフラグメントで消化した。結果として生ずるエリトロマイシン誘導性ｐ32プロモーター［Van der Vossen J M B M, Kodde J, Haandrikman A J, Venema G, Kok J；Appl. Environ. Microbiol 1992（58）3142-3149］の制御下のCGTase遺伝子を有するCGTaseタンパク質発現シャトルベクターpDP66Kをエリトロマイシン及びカナマイシン耐性についての選択下で大腸菌MC1061に形質転換した（図３）。

CGTase変異体の作製：プラスミドpDP66S（8.5kb）［Saenger W, Angew. Chem. 1980（19）344-362］での相対的に低い安定性のみが見られたので、pDP66K（7.7kb）を、強ｐ32プロモーター［van der Vossen J M B M, Kodde J, Haandrikman A J, Venema G, Kok J；Appl. Environ. Microbiol. 1992（58）3142-3149］の制御下でCGTase遺伝子と共に作製した（図３）。カナマイシンについての更なる抗生物質耐性マーカーを含むプラスミドpDP66Kは、ストレプトマイシン／スペクチノマイシン耐性カセットを含むプラスミドpDP66Sより大腸菌及びＢ．サブチリスにおいてかなりより安定であるようであった。シャトルベクターを用いて、野生型酵素及びCGTase変異体の高い細胞外生産を、α－アミラーゼ及びプロテアーゼ陰性Ｂ．サブチリス株DB104Aとのバッチ発酵で再現可能に得られた。１ｌのＢ．サブチリス株DB104A培養物を含む１つの５ｌエーレンマイカーフラスコは、25mgまでのCGTase変異体の均一性までの精製を許容した。部位特異的（PCR）変異誘発により変異体を作製した。特定のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、70％に近い変異頻度が観察された。全ての変異は制限分析及びDNA配列決定により確認した。

増殖条件：バクテリア株を有するプラスミドを、大腸菌及びバチルス・サブチルスについて各々100及び５μｇ／mlの濃度で抗生物質エリトロマイシン及びカナマイシンの存在下でLB培地上で増殖させた〔Sambrookら、前掲〕、適切な場合、寒天プレートはハロ形成のためにスクリーニングするために１％のデンプンを含んでいた。バチルス・サブチルス株DB104Aは、２％トリプトン、0.5％イースト抽出液、１％塩化ナトリウム及び１％カザミノ酸（pH7.0）を含み、10μｇ／mlエリトロマイシン及び５μｇ／mlカナマイシンを含む１ｌ培地を含む５ｌフラスコ中で増殖させた。

DNA操作：制限エンドヌクレアーゼ及びクレノウ酵素をPharmacia LKB Biotechnology, Swedenから購入し、製造元の説明書に従って用いた。DNA操作及び大腸菌株の塩化カルシウム形質転換を、記載される通りに行った〔Sambrookら、前掲〕。バチルス・サブチルスの形質転換を、Bronにより記載されるように行った［Harwood C R及びCutting S M, Eds.；Modern Microbiological Methoeds for Bacillus, 1990, Wiley & Sons, New York／Chichester；“Plasmids”, pp. 146-147］。

部位特異的変異誘発：変異を導入するために、我々は、第１のPCRをコード化鎖上の変異誘発プライマー＋テンプレート鎖上の910～1050bp下流のプライマーを用いて行うVENT－D

NAポリメラーゼ（New－England Biolaks, Beverly, MA, USA）を用いる２つのPCR反応に基づく方法を用いた。この反応の生成物（910～1050bp）を、次にコード化鎖上の760～900bp上流のプライマーと共に第２のPCRにおけるプライマーとして用いた。最終反応の生成物（1800bp）をBgII及びHindIIIで切断し、ベクターpDP66Kからの対応するフラグメント（600bp）と交換した。生じた（変異）プラスミドを大腸菌MC1061細胞に形質転換した。変異を作るために以下のオリゴヌクレオチド（プライマー）を用いた。

Y633A : 5'-G GTC GTT TAC CAG GCG CCG AAT TGG-3'

W616A : 5'-GC GAG CTC GGG AAC GCG GAC CCG-3'

W662A : 5'-CC GTC ACC GCG GAA GGC GGC-3'

成功した変異誘発は、潜在的な変異の迅速なスクリーニングを許容する下線の制限部位を示した。Y633Aのために、この制限部位は、NarＩであり、W616AについてはSacＩであり、そしてW662AについてはSacIIであった。

DNA配列決定：正しい制限部位を有するプラスミドpDP66Kを、大腸菌DH５α細胞に形質転換した。ジデオキシ鎖ターミネーション法［Sanger F, Coulson A R；J. Mol. Biol. 1975（94）441-448］及びPharmacia LKB Biotechnology（Sweden）を用いて、スーパーコイルプラスミドDNAで配列決定を行った。

CGTase変異体の生産及び精製：陽性とキャラクタライズされた変異CGTase遺伝子を有するプラスミドpDP66Kをバチルス・サブチルス株DB104Aに形質転換した。その生物を（約36時間）５ｌフラスコ内で600nmにおいて測定した4.5の光学座席まで増殖させた。これらの条件下で、高い細胞外CGTaseレベルを作った。その培養物を30分、４℃で遠心（×10,000ｇ）した。（変異）CGTaseを、ml当り3.5mgの最大容量の30ML　α－シクロデキストリン－Sepharose－６FFカラム（Pharmacia, Sweden）を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより均一になるまで更に精製した。10mMの酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.5）で洗った後、結合したCGTaseを10mg／ml　α－シクロデキストリンを含む同緩衝液で溶出した。

酵素アッセイ

β－シクロデキストリン形成活性：基質として５%Paselli™ SA2（即ちAVEBE, Foxhol, The Netherlandから利用できる50の平均重合度の部分的に加水分解されたポテトデンプン）を用いて、50℃で30分のインキュベーションの後に、β－シクロデキストリン形成活性を測定した。活性の0.1－0.1単位を用いた。形成されたβ－シクロデキストリンを、フェノールフタレインとの安定な無色包接複合体を形成する能力に基づいて測定した。活性の１単位を分当りのβ－シクロデキストリンの１μmolを形成することができる酵素の量として定義した。

生デンプン結合特性：生デンプン結合特性を、４℃で１時間、0.1mMのβ－シクロデキストリンあり及びなしで粒状ポテトデンプン（Paselli™ SA2, AVEBE, Foxhol, The Netherlandからのもの）の増加量（０～10%）と共に６μｇ／mlの酵素をインキュベートすることにより研究した。（10分以内に平衡に達した）。インキュベーションの後、デンプン粒子に結合したタンパク質を、４℃で１分間、10,000×ｇで遠心して落とし、その残りの上清のβ－シクロデキストリン形成活性を上述のように測定した。

速度研究：Paselli™ SA2（AVEBE, Foxhol, The Netherlands）での速度研究を、0.1又は0.2mMのβ－シクロデキストリンの添加あり又はなしで０～５%の範囲のPaselli™濃度でのβ－シクロデキストリン形成活性の測定により行った。これらの実験において、約0.6μｇ／ml（0.15～0.18単位）の酵素を用いた。

速度研究：あるいは、生デンプンでの速度研究を、０～50%の範囲の生デンプン濃度で10分間、６μｇ／mlの酵素をインキュベートすることにより行った。β－シクロデキストリン形成は上述の通り測定した。

これらの速度及び結合研究から収集されたデータを、ヒルの等式を用いて適合させ、結合研究についてのY_{max}及びK_{50}値、並びに速度研究についてのV_{max}及びK_{50}を算出した。K_i値は次の通り計算した。

非競合阻害： $$K_i = \frac{〔1〕}{\frac{V_{max-}}{V_{maxi}} - 1}$$

競合阻害 ： $$K_i = \frac{〔1〕}{\frac{K_{50-}}{K_{50}} - 1}$$

結　果

マルトース結合部位１（MBS1）は、２つのトリプトファン残基を含むので、二重変異体W616A／W662Aを行った。この方法において、我々は基質のグルコース単位との芳香族残基の疎水性相互作用を完全に除去するようにデザインした２つの結合部位においてかなりの変化を行った。２つの別個のCGTase変異体W616A及びW662Aは、二重変異体W616A／W662Aと比較して中間の結果を供した。

その曲線がミカエリスメンテンの等式よりヒルの等式によりよく適合する図４～６に供される結果から、反応及び結合速度に協同的に関連する形態が示される。

生デンプン結合実験の結果を表17及び図４に示す。生デンブン結合の測定が、W616A／W662Aについて鋭い減少を示したことは、MBS1が必要とされ、それが基質結合について最も高いアフィニティーを有することを示す。Y633A変異体は、アフィニティー及びY_{max}の少しだけの減少を示し、それはMBS2が生デンプン結合にほとんど寄与しないことを示す。

β－シクロデキストリンの生デンプンへの効果は、それが酵素の結合部位のためのデンプン鎖との競合により結合を阻害することができることを示す。この効果が野生型と比較して、生産された変異体についてより促進されることは、１つのMBSが削除された場合に、残った部位についての生デンプンとのβ－シクロデキストリンの競合がより強くなることを示す。これは、MBS間の協同性の形態も示す。

生デンプン結合に関する協同性の程度を示すヒル因子“ｎ”が、W616A／W662A変異体において大きく減少したことは、MBS1が協同的結合にかなり寄与することを示す。Y633A変異体は、野生型酵素と同じ“ｎ”値を有する。これは、結合においてMBS2以外の部位がMBS1と協同することを示唆する。

加水分解されたポテトデンプン（Paselli^{TM} SA2）での反応速度の結果を表18及び図５に示す。これらの結果は、野生型酵素におけるMBS2について他の役割を示す。Y633A変異体のPaselli^{TM}についてのより低いアフィニティーは、基質がその結合部位の欠如下で活性部位により効果的でなく導かれ得ることを示す。これは、反応速度において観察された協同性がこの変異体において損失されていることを示す因子“ｎ”の約１への減少によっても支持される。β－シクロデキストリンによる非競合から競合阻害へのシフトは、MBS2が非競合的生成物阻害に応答することを意味する。W616A／W662A変異体での結果は、MBS1がPaselli^{TM}の分解に少しだけ関連することを示す。

生デンプンでの反応速度実験の結果を表19及び図６に示す。これらの結果は、MBSのいずれかが削除された場合のアフィニティーのかなりの減少を示し、これは、生デンプンへの活性について、両方のMBSが等しく重要であることを示す。しかしながら、高い生デンプン濃度においては、W616A／W662A変異体を示す曲線が、野生型酵素のそれにアラインされることは、MBS1以外の結合部位がその機能を引き継ぐことを示唆する。この部位はＣドメイン上のMBS3であり得る。

これらの実験から、その結合部位を有するＥドメインは、生デンプンのシクロデキストリンへの転化に必要とされることが結論づけられた。酵素はMBS1を介して生デンプン粒子に結合し、他方MBS2は粒子から活性部位に伸びるデンプン鎖を導く。

表17

生デンプンへの結合特性

酵　素	Y_{max}		K_{50}（% RS）		n	
	0 mM β－CD	0.1mM β－CD	0 mM β－CD	0.1mM β－CD	0 mM β－CD	0.1mM β－CD
野生型	96.2 ±3.3	76.4 ±1.3	0.70 ±0.05	0.89 ±0.04	1.71 ±0.19	1.25 ±0.06
W616A/W662A	48.7 ±1.3	33.4 ±2.0	2.36 ±0.13	2.27 ±0.30	1.19 ±0.06	1.07 ±0.07
Y633A	90.8 ±2.2	58.4 ±5.9	0.99 ±0.05	2.70 ±0.58	1.73 ±0.12	1.34 ±0.20

表18

Paselli™ SA2で測定された速度特性

酵　素	V_{max} (units/mg)			K_{50} (% Paselli™ SA2)			n	K_i (nM)
	0 mM β－CD	0.1mM β－CD	0.2mM β－CD	0 mM β－CD	0.1mM β－CD	0.2mM β－CD		
野生型	280.4 ±2.6	221.0 ±3.7	184.5 ±1.6	0.098 ±0.003	0.077 ±0.005	0.071 ±0.002	1.40 ±0.12	0.38 ±0.02
W616A/W662A	247.2 ±3.0	224.5 ±1.6	212.6 ±1.2	0.115 ±0.005	0.104 ±0.002	0.109 ±0.002	1.26 ±0.12	1.11 ±0.14
Y633A	316.2 ±3.6	316.5 ±6.1	317.2 ±5.5	0.23 ±0.01	0.35 ±0.02	0.44 ±0.03	0.98 ±0.15	0.21 ±0.04

表19

生デンプンで測定された速度特性

酵　素	V_{max} (units/mg)	K_{50} (% RS)
野生型	153.1 ±4.8	18.4±1.3
W616A/W662A	(153.1)	(42.5)
Y633A	159.5 ±5.0	42.5±2.7

実施例４

バチルスからのβ－及びγ－シクロデキストリン生成性CGTaseの作製

本実施例は、部位特異的変異誘発が活性部位における水素結合の数を変えるいくつかのβ－及びγ－シクロデキストリン生成CGTase変異体の作製を記載する。変異体は、Lawsonら［Lawson C L, van MOntfort R, Strokopytov B, Rozeboom H J, Kalk K H, de Vries G E, Penninga D, Dijkhuizen L及びDijkstra B W, J. Mol. Biol. 1994 (236) 590-600］に記載されるように得られるバチルス・サーキュランス株251 CGTase（即ち野生型酵素）から得られる。

VENT－DNAポリメラーゼ（New－England Biolabs, Beverly, MA, USA）を用いるPCR法で変異を導入した。第１のPCR反応を、コード化鎖についての変異誘発プライマー＋テンプレート鎖上の下流のプライマーで行った。その反応生成物を、次に、コード化鎖上の上流のプライマーと一緒の第２のPCR反応におけるプライマーとして用いた。その最後の反応の生成物をPvuII及びSalＩで切断し、ベクターpDP66Kからの対応するフラグメント（1200bp）と交換した。生じた（変異）プラスミドを大腸菌MC1061細胞［Meissner P S, Sisk W P, Berman M L；Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1987 (84) 4171-4175］に形質転換した。

変異体を作るために以下のオリゴヌクレオチド（プライマー）を用いた。

N193G : 5'-GC ATC TAC AAG GGC CTG TACGAT CTC G-3' (DraⅢ) ;

Y89G : 5'-GCA TCA TCA ATG GAT CCG GCG TAA AC-3' (BamHⅠ) ;

*145al : 5'-CAT ACG TCG CCC GCT AGC ATT TCC GAC CAG CCT TCC -3' (NheⅠ) ;

D371G : 5'-CG GGC GGG ACC GGT CCG GAC AAC CG-3' (PinAⅠ) ;

D371N : 5'-G TCG GGC GGT ACC AAT CCG GAC AAC C-3' (KpnⅠ) ;

及び

N326Q : 5'-CG TTC ATC GAT CAG CAT GAC ATG G-3' (ClaⅠ)。

成功した変異誘発は潜在的な変異体の迅速なスクリーニングを許容する下線の制限部位に現れた。

正確な制限部位を有するプラスミドpDP66Kを大腸菌DH５α細胞［Hanahan D；J. Mol. Biol. 1983 (166) 557］に形質転換した。ジデオキシ鎖ターミネーション法［Sanger F, Cowlson A R；J. Mol. Biol. 1975 (94) 441-448］及びPharmacia-LKB Biotechnology, Swed

enからのT7－配列決定キットを用いてスーパーコイルプラスミドDNA上でDNA配列決定を行った。
陽性とキャラクタライズされた変異cgt遺伝子を有するプラスミドpDP66KをＢ．サブチリス株DB104A［Smith H, de Jong A, Bron S, Venema G；Gene 1988（70）351-361］に形質転換した。その生物を（約36時間）５ｌフラスコ中で4.5の600nmでの光学密度になるまで増殖させた。これらの条件下において、高い細胞外CGTaseレベルが作られた。
その培養物を10,000×ｇで30分間、40℃で遠心した。その培養物上清中のCGTase変異体を、ml当り3.5mgのタンパク質の最大容量の30ml　α－シクロデキストリン－Sepharose－６FFカラム（Pharmacia, Sweden）［Sundburg L, Porath J；C. Chromatogr. 1974（90）87-98］を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより均一になるまで更に精製した。10mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.5）で洗浄した後、結合したCGTaseを10mg／mlのα－シクロデキストリンを含む同緩衝液で溶出した。
β－シクロデキストリン形成活性を、50℃で３分間、適切に希釈された酵素サンプル（0.1～0.2単位の活性）をインキュベートすることにより測定した。50の平均重合度の部分的に加水分解されたポテトデンプンであるPaselli™ SA2（５％溶液）を、基質として用いた。形成されたβ－シクロデキストリンを、フェノールフタレインとの安定な無色包接複合体を形成する能力に基づいて測定した。活性の１単位を分当りのβ－シクロデキストリンの１μmolを生産することができる酵素の量として定義した。
シクロデキストリン形成活性を、生産工程条件下でも測定した。この目的のために、0.1U／mlのCGTaseを45時間、50℃において10mMクエン酸ナトリウム緩衝液（pH6.0）中で10％Paselli™ WA4（即ちジェットクックプレゼラチン化ドラム乾燥デンプン）と共にインキュベートした。一定の時間間隔でサンプルを収集し、10倍希釈して、８分間沸騰して、形成された生成物を、分当り１mlで、アセトニトリル／水（60／40　ｖ／ｖ）で溶出する25cm Econosphere－NH_2 ５ミクロ７カラム［Alltech Associates Inc., USA）を用いてHPLCにより分析した。
結　果
本実施例の変異体を、β－及びγ－シクロデキストリン形成を増加させるためにデザインした。N193G, Y89G, D371G, D371N及びY89G／N193G CGTase変異体は、全て、アミロース鎖と活性部位クレフトの第１の部分との間（サブ部位Ｃ－Ｇ）の相互作用を減少させる意図でデザインした。結果として、アミロース鎖は、活性部位クレフトへ更に動くことができ、これによりβ－及びγ－シクロデキストリンに向かうシクロデキストリンの比率を変化させるであろう。
N193G CGTase変異体は、β－シクロデキストリンの迅速な増加を示した（図７及び９）。結果として、その比は、５時間のインキュベーション（表20）の後、既に劇的にα－及びβ－シクロデキストリンに向かって変化する。しかしながら、45時間後（表21）、その比はα－シクロデキストリン形成に向かってのみ変化した。この変異は、他の変異、例えばD371G又はD371Nとの組み合わせに特によく適するようである。
Y89G　CGTase変異体は、α－シクロデキストリンの損失において、45時間のインキュベーション後にβ－シクロデキストリンに向かって少し変化した（図７及び表21）。
D371N及びD371G　CGTase変異体は、両方とも、より大きなシクロデキストリンの形成に向かうシフトを示す（図８及び表21）。β－及びγ－シクロデキストリンがα－シクロデキストリンの代償で増加した。このシフトは早いインキュベーション時間でより促進された（表20及び図10）。
Y89G／N193G二重変異体は、β－シクロデキストリンからのα－及びγ－シクロデキストリンの両方へのシフトを生じた（表21）。他の変異、特にD371G又はD371Nとの組み合わせにおいて、この変異はβ－シクロデキストリンへの単一シフトを生じ得た。
*145aI CGTase変異体を、アラインメント研究に基づいて作製した。この挿入変異は、β－シクロデキストリン生成性CGTase変異体を得るために特に有利であるようである。短いインキュベーション時間（図10及び表20）と長いインキュベーション時間（図８及び表21）の両方性、α－及びγ－シクロデキストリンの両方へのβ－シクロデキストリンからの

シフトを供した。また、β－シクロデキストリンへの単一シフトを得るために、この変異は、他の変異、例えばD371G又はD371Nとの組み合わせに特によく適しているようである。N326Q CGTase変異体を作製し、これは、α－シクロデキストリンからβ－及びγ－シクロデキストリン形成へのシフトを生じることが示された（表21）。
最後に、上述の変異の組み合わせは、β－及び／又はγ－シクロデキストリン形成の増加したCGTase変異体を得るために、直接的であるようである。

表20

10% Paselli™ WA4からのシクロデキストリン形成の比率（50℃，5時間）

酵　素	生成されたシクロデキストリン（%）		
	α	β	γ
野生型	7.4±1.4	70.8±1.8	21.8±0.5
N193G	13.5±0.2	57.5±0.7	29.0±0.8
Y89G	9.5±1.2	72.4±2.1	18.0±1.0
*145aI	18.8±1.2	46.3±1.3	34.3±1.5
D371G	2.4±0.2	71.8±1.6	25.9±1.4

表21

10% Paselli™ WA4からのシクロデキストリン形成の比率（50℃，45時間）

酵　素	生成されたシクロデキストリン（%）		
	α	β	γ
野生型	14.4±1.0	67.7±0.7	18.0±0.8
N193G	25.5±0.1	60.4±0.2	14.1±0.4
Y89G	12.7±0.3	69.3±0.6	18.0±0.3
*145aI	24.6±0.5	53.5±0.8	21.9±0.7
D371G	4.4±0.1	73.9±0.1	21.7±0.1
D371N	6.5±0.5	73.4±0.5	20.1±0.4
N326Q	5.0±0.1	75.4±0.1	19.6±0.2
Y89G/N193G	18.8±0.6	53.8±0.7	27.4±0.3
N193G/Q148E	17.5±0.5	60.9±0.7	21.6±0.8

表22

最初の環化の特異活性

酵　素	環化活性（U／mg）		
	α	β	γ
野生型	2	280	53
*145aI		111	59
N193G		132	66
N326Q	3	63	14
D371N	25	108	30
D371G	7	81	29

実施例５

サーモアナエロバクターからのα－シクロデキストリン生成物CGTase変異体の作製

本実施例は、部位特異的変異誘発が活性クレフトのサブ部位における水素結合の数を変化させ、又は基質結合クレフトの部分において立体障害を導く24のα－シクロデキストリン生成性CGTase変異体（Ａ１～Ａ24）の作製を記載する。
その変異体は、WO89/03421に従って得られたサーモアナエロバクター種CGTaseから得られ、配列番号：１～２（即ち野生型酵素）として供されるヌクレオチド及びアミノ酸配列を有する。
PWOポリメラーゼの使用によるPCRに基づく方法により、変異を導入した。各々の変異のために、特定のオリゴヌクレオチド（プライマー）を開発した。その変異体を、可能な限り制限分析により、及び配列決定により確認した。変異タンパク質を、大腸菌MC1061［Meissner P S, Sisk W P, Berman M L；Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1987（84）41714-4175］又はα－アミラーゼ及びプロテアーゼ陰性バチルス・サブチリス株DB104A［Smith H, de Jong A, Bron S, Venema G；Gene 1988（70）351-361］において発現させた。タンパク質を、アフィニティークロマトグラフィー（AfC）及び／又は陰イオン交換クロマトグラフィー（AEC）を用いて培地から精製した。
酵素アッセイ
酵素活性を、Phadebasアミラーゼテスト（Pharmacia）の少し改良し手順により測定した。Phadebas錠剤（Padebas™ Amylase Tese, Pharmacia）を基質として用いる。この基質は、ウシ血清アルブミン及び緩衝物質と混合した架橋された不溶性青色デンプンポリマーである。水に懸濁した後、デンプンを酵素により加水分解して青色フラグメントを生成した。60℃, pH6.2での0.15mMカルシウム中での15分のインキュベーションの後に測定を行う。620nmで測定した生じた青色溶液の吸光度は酵素活性に相当する。
その酵素活性を酵素標準のそれと比較し、その活性を酵素標準のそれと同じ単位で表現する。酵素標準をTermamyl™（Novo Nordisk A/D, Denmark）とした。そのデンプン分解活性は、基質としてポテトデンプンを用いて測定されている。この方法は、酵素により修飾されたポテトデンプンの分解に基づき、その反応の後、デンプン／酵素溶液のサンプルをヨウ素溶液と混合する。有色ガラス標準と比べて、最初は黒ずんだ青色が形成されたが、デンプンの分解の間、青色が弱くなり、次第に赤茶に変わった。
１キロNOVOαアミラーゼ単位（KNU）を、標準条件（即ち37℃＋／－0.05；0.0003M Ca^{2+}；及びpH5.6）下で5.26ｇのデンプン乾燥物質Merck Amylum溶解物をデキストリン化する（dextrinize）酵素の量として定義する。以下に、活性12ml当りのNOVO単位（NU）で表現する。
CGTase活性を、60℃で４～10分、10mMクエン酸ナトリウム、pH6.0中で基質と共に希釈した酵素をインキュベートすることにより、測定した。
シクロデキストリン形成活性を、基質として５%Paselli™（即ちAVEBE, Foxhol, The Netherlandsから利用できる50の平均重合度の部分的に加水分解されたポテトデンプン）を用いて測定した。形成されたα－シクロデキストリンをメチルオレンジで測定し、形成されたβ－シクロデキストリンをフェノールフタレインで測定し、そして形成されたγ－シクロデキストリンをブロモクレゾールグリーンで測定した。その活性をmg当りの単位で表す（Ｕ／mg）。酵素活性の１単位を分当りに特定のシクロデキストリンの１μmolを生産することができる酵素の量として定義する。
シクロデキストリン形成を、慣用的な工業生産工程条件下でも測定した。プレクックした（precooked）pH5.5の0.5mM $CaCl_2$中のアミロペクチン溶液を、24時間、60℃で基質のグラム当り50NUのCGTaseと共にインキュベートした。サンプルをHPLCにより分析する前に、規則的にとり、2.5～３のpHで10分間、沸騰した。
これらの実験の結果を以下の表23～25で議論し、そこに示す。表25において、図は、シクロデキストリンの最大の全体のレベルにおける比率である。
オリゴヌクレオチドプライマー
部位特異的変異誘発を始めるために、以下のオリゴヌクレオチドを合成した（番号はCGTaseナンバリングに従う位置を示す）。

Ａ１：　143－151(ＧＲＡＧＴＮＰＧ）；

5’-AATCATACATCTGGACGAGCAGGTACCAACCCGACTTTGGGGAAAATGGTAC-3’

；

Ａ２：87－94（ＩＫＹＳＧ－ＶＮＮ）＋143－151（ＧＲＡＧＴＮＰＯＧ）；
開始点として以下の実施例６に記載されるＢ９変異体（87－94（ＩＫＹＳＧ－ＶＮＮ））を用いて、143－151（ＧＲＡＧＴＮＰＧ）変異体をＡ１プライマーを用いて導入した。
Ａ３：F195Y＋143－151（ＧＲＡＧＴＮＰＧ）；
5'TTACCGTAATTTATATGACTTAGCAG-3'を用いてF195Y変異を導入し、開始点としてこの変異体を用いて、87－94（ＩＫＹＳＧ－ＶＮＮ）変異をＡ１プライマーを用いて導入した。
Ａ４：F195Y＋87－94（ＩＫＹＳＧ－ＶＮＮ）＋143－151（ＧＲＡＧＴＮＰＧ）；
Ａ２のSpeＩ－BstXＩフラグメントをF195Y変異を有するCGTase遺伝子に連結した。F195YをＡ３プライマーを用いることにより導入した。

Ａ５：　P143G－A144R －S145W ；

5’-ATCATACATCCGGACGATGGGAGACAGACCCTACC-3’

Ａ６：87－94（ＩＮＤＳＧ－ＶＮＮ）；

5’-CATTTACGCAGTTATCAATGATTCCGGAGTTAACAATACATCCTA-TCATGG-3’

；

Ａ７：87－94（ＩＮＤＳＧ－ＶＮＮ）＋146－150（ＳＤＱＰＳ）；
開始点としてＡ６変異体（87－94（ＩＮＤＳＧ－ＶＮＮ））を用いて、146－150（ＳＤＱＰＳ）変異を、プライマー5'-CTCCTGCATCATCTGATCAACCGTCCTTTGGGGAAAATGG-3'を用いて導入した。

Ａ８：　143－148(ＧＲＧＰＡＡ）；

5'-CAAATCATACATCTGGACGAGGACCGGCCGCACCTACCTATGGGG-3'　；

Ａ９：　143－148(ＧＲＡＰＡＡ）；

5'-CAAATCATACATCTGGACGAGCACCGGCCGCACCTACCTATGGGG-3'　；

Ａ10：　143－148(ＧＲＡ**Ａ）；

5'-CAAATCATACATCTGGACGAGCAGCACCTACCTATGGGG-3'　；

Ａ11：　143－148(ＧＲＰＡＡＡ）；

5'-CAAATCATACATCTGGACGACCTGCAGCAGCTCCTACCTATGGGG-3'　；

Ａ12：G180S　；

5'-CCATCATTACGGATCCACTAATTTTTCATC-3'；

Ａ13：A144R　；

5'-CATACATCTCCTCGATCGGAGACAGACCC-3'　；

Ａ14：　P143A－A144R　；

5'-CATACATCTGCTCGATCGGAGACAGACCC-3'　；

Ａ15：G180N　；

5'-CCATCATTACGGAAACACTAATTTTTCATC-3'；

Ａ16：G180D　；

5'-CCATCATTACGGAGACACTAATTTTTCATC-3'；

Ａ17：G180N＋P143G－A144R－S145W；

開始点としてＡ５変異体（P143G－A144R－S145W）を用いて、G180N変異をプライマー5'-CCATCATTACGGAAACACTAATTTTTCATC-3'を用いて導入した。

Ａ18：G180D＋P143G－A144R－S145W；

開始点としてＡ５変異体（P143G－A144R－S145W）を用いて、G180N変異をプライマー5'-CCATCATTACGGAGACACTAATTTTTCATC-3'を用いて導入した。

Ａ19：G179N　；

5'-CCATCATTATAATGGAACTAATTTTTCATC-3'；

Ａ20：G179S　；

5'-CCATCATTATAGTGGAACTAATTTTTCATC-3'；

Ａ21：G179D　；

5'-CCATCATTATGATGGAACTAATTTTTCATC-3'；

Ａ22：G179N＋P143G－A144R－S145W；

開始点としてＡ５変異体（P143G－A144R－S145W）を用いて、G180N変異をプライマー5'-CCATCATTATAATGGAACTAATTTTTCATC-3'を用いて導入した。

Ａ23：G179S＋P143G－A144R－S145W；
開始点としてＡ５変異体（P143G－A144R－S145W）を用いて、G180N変異をプライマー5'-CCATCATTATAGTGGAACTAATTTTTCATC-3'を用いて導入した。
Ａ24：G179D＋P143G－A144R－S145W；
開始点としてＡ５変異体（P143G－A144R－S145W）を用いて、G180N変異をプライマー5'-CCATCATTATGATGGAACTAATTTTTCATC-3'を用いて導入した。
結　果
本実施例の変異体は、α－シクロデキストリン形成を増加させるためにデザインした。
実験Ａ１において、酵素とグルコース単位Ｈとの間の相互作用を増加させ、並びに酵素とグルコース単位Ｉ及びＪとの間の相互作用を減少させるために、位置143～151のループを（ＧＲＡＧＴＮＰＧ）により置換した（図１）。β－CD形成及びγ－CD形成の両方の開始比率は減少した。CD生産アッセイにおいてα－CDの比は増加したが、β－CD比は減少した。
実験Ａ２において、酵素とグルコース単位Ｅ，Ｆ及びＨとの間の相互作用を増加させるため、並びに酵素とグルコース単位Ｉ及びＪとの間の相互作用を減少させるために、位置87～94のループを（ＩＫＹＳＧ*ＶＮＮ）により置換し、同時に位置143～151のループを（ＧＲＡＧＴＮＰＧ）により置換した（図１）。β－CD形成及びγ－CD形成の開始比率は減少した。
実験Ａ３において、酵素とグルコース単位１－１との間の相互作用を増加させ、並びに酵素とグルコース単位Ｉ及びＪとの間の相互作用を減少させるために、位置143～151のループを（ＧＲＡＧＴＮＰＧ）により置換した（図１）。同時に、酵素と基質との間の接触を減少させるために、F195を195Yにより置換した。β－CD形成及びγ－CD形成の両方の開始比率は減少した。CD生産アッセイにおいてα－CDの比は増加したが、β－CD比は減少した。
実験Ａ４において、酵素とグルコース単位Ｅ，Ｆ及びＨとの間の相互作用を増加させるため、並びに酵素とグルコース単位Ｉ及びＪとの間の相互作用を減少させるために、位置87～94のループを（ＩＫＹＳＧ*ＶＮＮ）により置換し、同時に位置143～151のループを（ＧＲＡＧＴＮＰＧ）により置換した（図１）。同時に、酵素と基質との間の接触を減少させるために、F195を195Yにより置換した。β－CD形成の開始比率は減少した。CD生産アッセイにおいて、β－CD比は減少した。
実験Ａ５において、立体障害を作ることにより酵素とグルコース単位１－１との間の相互作用を増加させ、並びに酵素とグルコース単位Ｉ及びＪとの間の相互作用を減少させるために、位置143～145のループを（ＧＲＷ）により置換した（図１）。α－CD形成の開始速度は増加したが、β－CD形成及びγ－CD形成の両方の開始速度は減少した。CD生産アッセイにおいてα－CDの比は増加したが、β－CD比は減少した。
実験Ａ６において、酵素とグルコース単位Ｅ及びＦとの間の相互作用を増加させるために、位置87～94のループを（ＩＫＤＳＧ*ＶＮＮ）により置換した（図１）。
実験Ａ７において、酵素とグルコース単位Ｅ及びＦとの間の相互作用を増加させるため、並びに酵素とグルコース単位Ｉ及びＪとの間の相互作用を減少させるために、位置87～94のループを（ＩＫＤＳＧ*ＶＮＮ）により置換し、同時に位置146～150のループを（ＳＤＱＰＳ）により置換した（図１）。
実験Ａ８において、酵素とグルコース単位Ｈとの間の相互作用を増加させるため、並びに酵素とグルコース単位Ｉ及びＪとの間の相互作用を減少させるために、位置143～148のループを（ＧＲＧＰＡＡ）により置換した（図１）。
実験Ａ９において、酵素とグルコース単位Ｈとの間の相互作用を増加させ、並びに酵素とグルコース単位Ｉ及びＪとの間の相互作用を減少させるために、位置143～148のループを（ＧＲＡＰＡＡ）により置換した。
実験Ａ10において、酵素とグルコース単位Ｈとの間の相互作用を増加させるため、並びに酵素とグルコース単位Ｉ及びＪとの間の相互作用を減少させるために、位置143～148のループを（ＧＲＡ**Ａ）により置換した（図１）。

実験Ａ11において、酵素とグルコース単位Ｈとの間の相互作用を増加させるため、並びに酵素とグルコース単位Ｉ及びＪとの間の相互作用を減少させるために、位置143～148のループを（ＧＲＷ）により置換した（図１）。β－CD形成及びγ－CD形成の両方の開始比率はα－CD形成の開始比率より大きく減少し、結果としてα－CD形成とβ－CD形成との間の比が増加した。
実験Ａ12において、酵素とグルコース単位Ｈとの間の相互作用を増加させるために、G180を180Sにより置換した（図１）。
実験Ａ13において、酵素とグルコース単位Ｈとの間の相互作用を増加させるために、A144を144Rにより置換した（図１）。
実験Ａ14において、酵素とグルコース単位Ｈとの間の相互作用を増加させるために、P143－A144を143A－144Rにより置換した（図１）。
実験Ａ15において、酵素とグルコース単位Ｈとの間の相互作用を増加させるために、G180を180Nにより置換した（図１）。
実験Ａ16において、酵素とグルコース単位Ｈとの間の相互作用を増加させるために、G180を180Dにより置換した（図１）。
実験Ａ17において、酵素とグルコース単位Ｈとの間の相互作用を増加させるために、G180を180Nにより置換した（図１）。同時に、立体障害を作ることにより、酵素とグルコース単位Ｈとの間の相互作用を増加させるため、並びに酵素とグルコース単位Ｉ及びＪとの間の相互作用を減少させるために、位置143～145の領域を（ＧＲＷ）により置換した（図１）。
実験Ａ18において、酵素とグルコース単位Ｈとの間の相互作用を増加させるために、G180を180Dにより置換した（図１）。同時に、立体障害を作ることにより、酵素とグルコース単位Ｈとの間の相互作用を増加させるため、並びに酵素とグルコース単位Ｉ及びＪとの間の相互作用を減少させるために、位置143～145の領域を（ＧＲＷ）により置換した（図１）。
実験Ａ19において、酵素とグルコース単位Ｈとの間の相互作用を増加させるために、G179を179Nにより置換した（図１）。
実験Ａ20において、酵素とグルコース単位Ｈとの間の相互作用を増加させるために、G179を179Sにより置換した（図１）。
実験Ａ21において、酵素とグルコース単位Ｈとの間の相互作用を増加させるために、G179を179Dにより置換した（図１）。
実験Ａ22において、酵素とグルコース単位Ｈとの間の相互作用を増加させるために、G179を179Nにより置換した（図１）。同時に、立体障害を作ることにより、酵素とグルコース単位Ｈとの間の相互作用を増加させるため、並びに酵素とグルコース単位Ｉ及びＪとの間の相互作用を減少させるために、位置143～145の領域を（ＧＲＷ）により置換した（図１）。
実験ABBEにおいて、酵素とグルコース単位Ｈとの間の相互作用を増加させるために、G179を179Sにより置換した（図１）。同時に、立体障害を作ることにより、酵素とグルコース単位Ｈとの間の相互作用を増加させるため、並びに酵素とグルコース単位Ｉ及びＪとの間の相互作用を減少させるために、位置143～145の領域を（ＧＲＷ）により置換した（図１）。
実験Ａ24において、酵素とグルコース単位Ｈとの間の相互作用を増加させるために、G179を179Dにより置換した（図１）。同時に、立体障害を作ることにより、酵素とグルコース単位Ｈとの間の相互作用を増加させるため、並びに酵素とグルコース単位Ｉ及びＪとの間の相互作用を減少させるために、位置143～145の領域を（ＧＲＷ）により置換した（図１）。

表23

CGTaseの生産、精製及び酵素活性

酵　素	宿　主	精製法	酵素活性（NU／mg）
野生型	大腸菌	AfC	1513
A 1	大腸菌	AfC	432
A 2	大腸菌	AfC	1009
A	大腸菌	AfC	1404
A 4	大腸菌	AfC	1082
A 5	大腸菌	AfC＋AEC	2100
A 9	大腸菌		
A 10	大腸菌		
A 11	大腸菌	AfC＋AEC	2200

表24

α－，β－及びγ－CD形成性CGTaseの特異活性

酵　素	環化活性（U／mg）		
	α	β	γ
野生型	39	49	40
A 1		26	29
A 2		32	36
A		24	26
A 4		32	39
A 5	43	27	27
A 11	20	6	13

表25

最適CD形成におけるシクロデキストリン形成の比率

酵　素	生成されたシクロデキストリン（％）		
	α	β	γ
野生型	39	45	17
A 1	42	38	20
A 2	38	45	17
A	42	38	20
A 4	39	41	20
A 5	43	37	20

実施例６

サーモアナエロバクターからのβ－シクロデキストリン生成性CGTase変異体の作製

本実施例は、部位特異的変異誘発が活性クレフトのサブ部位における水素結合の数を変化させ、又は基質結合クレフトの部分において立体障害を導く15のβ－シクロデキストリン生成性CGTase変異体（Ｂ１～Ｂ９）の作製を記載する。

その変異体は、WO89/03421に従って得られたサーモアナエロバクター種CGTaseから得られ、配列番号：１～２（即ち野生型酵素）として供されるヌクレオチド及びアミノ酸配列を有する。

PWOポリメラーゼの使用によるPCRに基づく方法により、変異を導入した。各々の変異のために、特定のオリゴヌクレオチド（プライマー）を開発した。その変異体を、可能な限り制限分析により、及び配列決定により確認した。変異タンパク質を、大腸菌MC1061［Meissner P S, Sisk W P, Berman M L；Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1987（84）4171-4175］又はα－アミラーゼ及びプロテアーゼ陰性バチルス・サブチリス株DB104A［Smith H, de Jong A, Bron S, Venema G；Gene 1988（70）351-361］において発現させた。タンパク質を、アフィニティークロマトグラフィー（AfC）及び／又は陰イオン交換クロマトグラフィー（AEC）を用いて培地から精製した。

酵素アッセイ

酵素活性を、Phadebasアミラーゼテスト（Pharmacia）の少し改良した手順により測定した。Phadebas錠剤（Phadebas^{TM} Amylase Tese, Pharmacia）を基質として用いる。この基質は、ウシ血清アルブミン及び緩衝物質と混合した架橋された不溶性青色デンプンポリマーである。水に懸濁した後、デンプンを酵素により加水分解して青色フラグメントを生成した。60℃, pH6.2での0.15nMカルシウム中での15分のインキュベーションの後に測定を行う。620nmで測定した生じた青色溶液の吸光度は酵素活性に相当する。

その酵素活性を酵素標準のそれと比較し、その活性を酵素標準のそれと同じ単位で表現する。酵素標準をTermamyl^{TM}（Novo Nordisk A/D, Denmark）とした。そのデンプン分解活性は、基質としてポテトデンプンを用いて測定されている。この方法は、酵素により修飾されたポテトデンプンの分解に基づき、その反応の後、デンプン／酵素溶液のサンプルをヨウ素溶液と混合する。有色ガラス標準と比べて、最初は黒ずんだ青色が形成されたが、デンプンの分解の間、青色が弱くなり、次第に赤茶に変わった。

１キロNOVOαアミラーゼ単位（KNU）を、標準条件（即ち37℃＋／－0.05；0.0003M Ca^2

$^{+}$；及びpH5.6）下で5.26ｇのデンプン乾燥物質Merck Amylum溶解物をデキストリン化する（dextrinize）酵素の量として定義する。以下に、活性12ml当りのNOVO単位（NU）で表現する。

CGTase活性を、85℃で４～10分、10mMクエン酸ナトリウム、pH6.0中で基質と共に希釈した酵素をインキュベートすることにより、測定した。

シクロデキストリン形成活性を、基質として５％Paselli^{TM}（即ちAVEBE, Foxhol, The Netherlandsから利用できる50の平均重合度の部分的に加水分解されたポテトデンプン）を用いて測定した。形成されたα－シクロデキストリンをメチルオレンジで測定し、形成されたβ－シクロデキストリンをフェノールフタレインで測定し、そして形成されたγ－シクロデキストリンをブロモクレゾールグリーンで測定した。その活性をmg当りの単位で表す（Ｕ／mg）。酵素活性の１単位を分当りに特定のシクロデキストリンの１μmolを生産することができる酵素の量として定義する。

シクロデキストリン形成を、慣用的な工業生産工程条件下でも測定した。プレクックした（Precooked）pH5.5の0.5mM $CaCl_2$中のアミロペクチン溶液を、24時間、85℃で基質のグラム当り50NUのCGTaseと共にインキュベートした。サンプルをHPLCにより分析する前に、規則的にとり、2.5～３のpHで10分間、沸騰した。

これらの実験の結果を以下の表26～28で議論し、そこに示す。表28において、図は、シクロデキストリンの最大の全体のレベルにおける比率である。

オリゴヌクレオチドプライマー

部位特異的変異誘発を始めるために、以下のオリゴヌクレオチドを合成した（番号はCGTaseナンバリングに従う位置を示す）。

Ｂ１：S145A ；

5’-CTCCTGCAGCTGAGACAGACCC-3’；

Ｂ２：E146S ；

5-CTCCTGCATCGTCGACAGACCC-3’ ；

Ｂ３：T147A ；

5’-TCAGAGGCGGATCCTACCTATGG-3’ ；

Ｂ４：T147L ；

5’-TCAGAGCTCGACCCTACCTATGG-3’ ；

Ｂ５：D148A ；

5’-CAGAGACGGCGCCTACCTATGGGG-3’；

Ｂ６：D89A；

5-CGCAGTTTTGCCGGCTTCCAC-3’；

Ｂ７：F91aA ；

5’-TCCACTGCCGGCGGAAGCAC-3’；

Ｂ８：F91a* ；

5’-AGATTCTACCGGTGGAAGCAC-3’ ；

Ｂ９：87－94（ＩＫＹＳＧ－ＶＮＮ）；

5’-TTTACGCAGTTATTAAATATTCCGGCGTTAACAACACATCCTATCA-TGG-3’。

この変異体は上述の実施例５のＡ２の作製にも用いられる。

Ｂ10：F195Y＋87－94（ＩＫＹＳＧ－ＶＮＮ）；

5'-TTACCGTAATTTATATGACTTAGCAG-3'を用いてF195Y変異を導入した。開始点としてこの変異体を用いて、87－94（ＩＫＹＳＧ－ＶＮＮ）変異体をプライマーＢ９を用いて導入した。同時に、酵素と基質との間の接触を減少させるために、F195を195Yにより置換した。

Ｂ11：D196S ；

5’-CGTAATTTATTCTCGCTAGCAGATTTAG-3’；

Ｂ12：D196A ；

5’-CGTAATTTATTCGCGCTAGCAGATTTAG-3’；

Ｂ13：D371N ；

5’-CAGGTAATGGTAACCCTTATAATAGAGC-3’；

Ｂ14：D371G ；

5’-CAGGTAATGGAGGGCCTTATAATAGAGC-3’；及び

Ｂ15：D371A ；

5’-CAGGTAATGGAGCGCCTTATAATAGAGC-3’。

結　果

本実施例の変異体は、β－シクロデキストリン形成を増加させるためにデザインした。

実験Ｂ１において、酵素とグルコース単位Ｊとの間の相互作用を減少させるために、Ｓ145を145Aにより置換した（図１）。β－CD形成及びγ－CD形成の両方の開始比率は増加した。CD生産アッセイにおいてα－CDの比は減少したが、β－CD比は増加した。

実験Ｂ２において、酵素とグルコース単位Ｉとの間の相互作用を増加させるために、E146を146Sにより置換した（図１）。β－CD形成及びγ－CD形成の開始比率は減少した。CD生成アッセイにおいて、α－CDの比率は減少した。

実験Ｂ３において、酵素とグルコース単位Ｊとの間の相互作用を減少させるために、T147を147Aにより置換した（図１）。CD生産アッセイにおいてα－CDの比は減少したが、β－CD比は増加した。

実験Ｂ４において、酵素とグルコース単位Ｊとの間の相互作用を減少させるために、T147を147Lにより置換した（図１）。CD生産アッセイにおいて、α－CDの比率は減少したが、β－CD比率は増加した。

実験Ｂ５において、酵素とグルコース単位Ｊとの間の相互作用を減少させるために、D148を148Aにより置換した（図１）。CD生産アッセイにおいて、α－CDの比率は減少したが、β－CD比率は増加した。

実験Ｂ６において、酵素とグルコース単位Ｆとの間の相互作用を減少させるために、Ｄ89を89Ａにより置換した（図１）。β－CD形成及びγ－CD形成の開始比率が減少した。

実験Ｂ７において、酵素とグルコース単位Ｆとの間の相互作用を減少させるために、Y91Aを91aAにより置換した（図１）。β－CD形成及びγ－CD形成の開始比率が減少した。

実験Ｂ８において、酵素とグルコース単位Ｆとの間の相互作用を減少させるために、Y91aをY91a*（欠失）により置換した（図１）。β－CD形成の開始比率が減少した。

実験Ｂ９において、酵素とグルコース単位Ｅとの間の接触を増加させるために、位置87～94を（ＩＫＹＳＧ*ＶＮＮ）により置換した（図１）。

実験Ｂ10において、5'-TTACCGTAATTTATATGACTTAGCAG-3'を用いてF195Y変異を導入した。開始点としてこの変異体を用いて、87－94（ＩＫＹＳＧ－ＶＮＮ）変異をプライマーＢ９を用いて導入した。同時に、酵素と基質との間の接触を減少させるために、F195を195Yにより置換した。

実験Ｂ11において、酵素とグルコース単位Ｅとグルコース単位Ｆとの間の相互作用を減少させるために、D196を196Sにより置換した。

実験Ｂ12において、酵素とグルコース単位Ｅとグルコース単位Ｆとの間の相互作用を減少させるために、D196を196Aにより置換した。

実験Ｂ13において、酵素とグルコース単位Ｅとグルコース単位Ｆとの間の相互作用を増加させるために、D371を371Nにより置換した。
実験Ｂ14において、酵素とグルコース単位Ｅとグルコース単位Ｆとの間の相互作用を減少させるために、D371を371Gにより置換した。
実験Ｂ15において、酵素とグルコース単位Ｅとグルコース単位Ｆとの間の相互作用を減少させるために、D371を371Aにより置換した。

表26

CGTaseの生産、精製及び酵素活性

酵　素	宿　主	精製法	酵素活性（NU／ml）
野生型	バチルス	AfC	1513
Ｂ１	バチルス	AfC	1925
Ｂ２	バチルス	AfC	2290
Ｂ３	バチルス	AfC	1636
Ｂ４	バチルス	AfC	1949
Ｂ５	バチルス	AfC	1839
Ｂ６	大腸菌	AfC	1908
Ｂ７	大腸菌	AfC	1686
Ｂ８	大腸菌	AfC	1212
Ｂ９	大腸菌	AfC	1862

表27

α－，β－及びγ－CD形成性CGTase

酵　素	環化活性（U／mg）		
	α	β	γ
野生型	39	131	96
B 1		150	140
B 2		140	120
B 3		120	84
B 4		110	97
B 5		120	82
B 6		101	84
B 7		107	80
B 8		118	97
B 9		131	63

表28

最適CD形成におけるシクロデキストリン形成の比率

酵　素	生成されたシクロデキストリン（%）		
	α	β	γ
野生型	39	45	17
B 1	35	49	16
B 2	35	46	18
B 3	35	48	16
B 4	35	49	16
B 5	35	49	16
B 9	35	48	17

実施例7

サーモアナエロバクターからのβ－シクロデキストリン生成性CGTase変異体の作製
本実施例は、部位特異的変異誘発が活性クレフトのサブ部位における水素結合の数を変化させ、又は基質結合クレフトの部分において立体障害を導く９のβ－シクロデキストリン生成性CGTase変異体（Ｃ１～Ｃ９）の作製を記載する。
その変異体は、WO89/03421に従って得られたサーモアナエロバクター種CGTaseから得られ、配列番号：１～２（即ち野生型酵素）として供されるヌクレオチド及びアミノ酸配列を有する。
供給元（Stratagene▲R▼）からのプロトコルに従って、特有部位除去（Unigue Site Elimination（USE））に基づく方法により変異体を導入した。CGTase遺伝子と反対のプロスミドにおける特有の制限部位BsaＭＩを、5'P-CACTGTTCCTTCGAACGCGTAACCTTAAATACC-3'オリゴヌクレオチドを用いることにより除去した。このオリゴヌクレオチドにおいて“Ｐ”は、その手順に必要な５’リン酸化を示す。各々の変異について、特定のオリゴヌクレオチドを開発した。その変異体を、可能な限り制限分析により、及び配列決定により確認した。変異タンパク質を、大腸菌MC1061［Meissner P S, Sisk W P, Berman M L；Proc. Natl. Acad. Sci USA 1987（84）4171-4175］において発現させた。タンパク質を、アフィニティークロマトグラフィー（AfC）を用いて培地から精製した。
酵素アッセイ
酵素活性を、Phadebasアミラーゼテスト（Pharmacia）の少し改良した手順により測定した。Phadebas錠剤（Phadebas™ Amylase Tese, Pharmacia）を基質として用いる。この基質は、ウシ血清アルブミン及び緩衝物質と混合した架橋された不溶性青色デンプンポリマーである。水に懸濁した後、デンプンを酵素により加水分解して青色フラグメントを生成した。60℃, pH6.2での0.15mMカルシウム中での15分のインキュベーションの後に測定を行う。620nmで測定した生じた青色溶液の吸光度は酵素活性に相当する。
その酵素活性を酵素標準のそれと比較し、その活性を酵素標準のそれと同じ単位で表現する。酵素標準をTermamyl™（Novo Nordisk A/D, Denmark）とした。そのデンプン分解活性は、基質としてポテトデンプンを用いて測定されている。この方法は、酵素により修飾されたポテトデンプンの分解に基づき、その反応の後、デンプン／酵素溶液のサンプルをヨウ素溶液と混合する。有色ガラス標準と比べて、最初は黒ずんだ青色が形成されたが、デンプンの分解の間、青色が弱くなり、次第に赤茶に変わった。
１キロNOVOαアミラーゼ単位（KNU）を、標準条件（即ち37℃＋／－0.05；0.0003M Ca^{2+}；及びpH5.6）下で5.26ｇのデンプン乾燥物質Merck Amylun溶解物をデキストリン化する（dextrinize）酵素の量として定義する。以下に、活性12ml当りのNOVO単位（NU）で表現する。
CGTase活性を、85℃で４～10分、10mMクエン酸ナトリウム、pH6.0中で基質と共に希釈した酵素をインキュベートすることにより、測定した。
シクロデキストリン形成活性を、基質として５%Paselli™（即ちAVEBE, Foxhol, The Netherlandsから利用できる50の平均重合度の部分的に加水分解されたポテトデンプン）を用いて測定した。形成されたα－シクロデキストリンをメチルオレンジで測定し、形成されたβ－シクロデキストリンをフェノールフタレインで測定し、そして形成されたγ－シクロデキストリンをブロモクレゾールグリーンで測定した。その活性をmg当りの単位で表す（Ｕ／mg）。酵素活性の１単位を分当りに特定のシクロデキストリンの１μmolを生産することができる酵素の量として定義する。
シクロデキストリン形成を、慣用的な工業生産工程条件下でも測定した。プレクックした（precooked）pH5.5の0.5mM $CaCl_2$中のアミロペクチン溶液を、24時間、60℃で基質のグラム当り50NUのCGTaseと共にインキュベートした。サンプルをHPLCにより分析する前に、規則的にとり、2.5～３のpHで10分間、沸騰した。
これらの実験の結果を以下の表29～31で議論し、そこに示す。表31において、図は、シクロデキストリンの最大の全体のレベルにおける比率である。
オリゴヌクレオチドプライマー
部位特異的変異誘発を始めるために、以下のオリゴヌクレオチドを合成した（番号はCGTa

seナンバリングに従う位置を示す）。

Ｃ１：N193A ；

5'P-TTACCGTGCACTATTTGACTTAGC-3' ；

Ｃ２： 146－150（ＳＤＱＰＳ） ；

5'P-CTCCTGCATCATCTGATCAACCGTCCTTTGGGGAAAATGG-3' ；

Ｃ３： 145－148（ＡＥＬＡ） ；

5'P-CATCTCCTGCAGCAGAGCTCGCACCTACCTATGGG-3' ；

Ｃ４： 145－148（ＡＥＷＡ） ；

5'P-CATCTCCTGCAGCAGAGTGGGCACCTACCTATGGG-3' ；

Ｃ５：87－94（ＩＮＹＳＧ* ＶＮＮ） ；

5'P-CATTTACGCAGTTATCAATTATTCCGGAGTTAACAATACATCCTATCATGG-3' ；

Ｃ６：87－94（ＨＰ* ＳＧＹ*** ） ；

5'P-CATTTACGCAGTTCATCCTTCCGGGTATACATCCTATCATGG-3' ；

Ｃ７： 145－148（ＬＥＴＮ） ；

5'P-TACATCTCCTGCACTCGAGACAAATCCTACCTATGG-3' ；

Ｃ８：87－94（ＨＰ* ＳＧＹ***）＋145－148（ＬＥＴＮ）；
Ｃ６及びＣ７としてリストされる両方のプライマーを同時に用いた。
Ｃ９：87－94（ＩＮＹＳＧ*ＶＮＮ）＋146－150（ＳＤＱＰＳ）；
Ｃ２及びＣ５としてリストされた両方のプライマーを同時に用いた。

結　果

本実施例の変異体は、β－シクロデキストリン形成を増加させるためにデザインした。
実験Ｃ１において、酵素とグルコース単位Ｈとの間の相互作用を減少させるために、N193を193Aにより置換した。CD生産アッセイにおいてα－CDの比は減少したが、β－CD比は増加した。
実験Ｃ２において、酵素とグルコース単位Ｊとの間の相互作用を減少させるため、並びに酵素とグルコース単位Ｉとの間の相互作用を増加させるために、位置146～150の領域を（ＳＤＱＰＳ）により置換した。
実験Ｃ３において、酵素とグルコース単位Ｊとの間の相互作用を減少させ、並びに酵素とグルコース単位Ｉとの間の相互作用を減少させるために、位置145～148の領域を（ＡＥＬＡ）により置換した。
実験Ｃ４において、酵素とグルコース単位Ｊとの間の相互作用を減少させるため、並びに酵素とグルコース単位Ｉとの間の相互作用を増加させるために、位置145～148の領域を（ＡＥＷＡ）により置換した。
実験Ｃ５において、酵素とグルコース単位Ｅ及びグルコース単位Ｆとの間の相互作用を減少させるために、位置87～94のループを（ＩＮＹＳＧ*ＶＮＮ）により置換した。
実験Ｃ６において、酵素とグルコース単位Ｅとグルコース単位Ｆとの間の相互作用を減少させるために、位置87～94のループを（ＨＰ* ＳＧＹ***）により置換した。

実験Ｃ７において、酵素とグルコース単位Ｊとの間の相互作用を減少させるため、並びに酵素とグルコース単位Ｉとの間の相互作用を増加させるために、位置145～148の領域を（ＬＥＴＮ）により置換した。
実験Ｃ８において、酵素とグルコース単位Ｅとグルコース単位Ｆとの間の相互作用を減少させるために、位置87～94のループを（ＨＰ* ＳＧＹ***）により置換した。同時に、酵素とグルコース単位Ｊとの間の相互作用を減少させるため、並びに酵素とグルコース単位Ｉとの間の相互作用を増加させるために、位置145～148のループを（ＬＥＴＮ）により置換した。
実験Ｃ９において、酵素とグルコース単位Ｅとグルコース単位Ｆとの間の相互作用を減少させるために位置87～94のループを（ＩＮＯＹＳＧ*ＶＮＮ）により置換した。同時に、酵素とグルコース単位Ｊとの間の相互作用を減少させるため、及び酵素とグルコース単位Ｉとの間の相互作用を増加させるために、位置145～148の領域を（ＳＤＱＰＳ）により置換した。

表29

CGTaseの生産、精製及び酵素活性

酵　素	宿　主	精製方法	酵素活性（NU／ml）
野生型	大腸菌	AfC	1513
Ｃ１	大腸菌	AfC	1643

表30

α－，β－，γ－CD形成性CGTaseの特異活性

酵　素	環化活性（U／mg）		
	α	β	γ
野生型	39	131	96
Ｃ１		102	90

表31

最適CD形成におけるシクロデキストリン形成の比率

酵　素	生成されたシクロデキストリン（%）		
	α	β	γ
野生型	39	45	17
C 1	35	49	16

配列表

（2）配列番号：1の情報：

（i）配列の特徴：

（A）配列の長さ：2133塩基対

（B）配列の型：核酸

（C）鎖の数：一本鎖

（D）トポロジー：直鎖状

（ii）分子の型：cDNA

（vi）起源：

（A）生物名：Thermoanaerobacter sp.

（B）株名：ATCC 53627

（ix）特徴：

（A）名称／キー：CDS

（B）位置：82..2130

（xi）配列の記載：配列番号：1

```
ATGAAGAAAA CGCTTAAACT TCTGTCGATT CTGTTGATAA CCATTGCTCT TCTTTTCAGC      60

TCAATTCCAT CCGTACCGGC A GCA CCG GAT ACT TCA GTT TCC AAT GTT GTC        111
                        Ala Pro Asp Thr Ser Val Ser Asn Val Val
                          1               5                  10

AAT TAT TCA ACA GAT GTA ATC TAC CAG ATA GTC ACA GAC CGT TTT TTA        159
Asn Tyr Ser Thr Asp Val Ile Tyr Gln Ile Val Thr Asp Arg Phe Leu
                    15                  20                  25

GAT GGG AAT CCC AGT AAT AAT CCA ACA GGC GAC TTA TAT GAC CCT ACC        207
Asp Gly Asn Pro Ser Asn Asn Pro Thr Gly Asp Leu Tyr Asp Pro Thr
               30                  35                  40

CAT ACT AGT TTA AAG AAA TAT TTT GGT GGC GAT TGG CAG GGT ATT ATT        255
His Thr Ser Leu Lys Lys Tyr Phe Gly Gly Asp Trp Gln Gly Ile Ile
          45                  50                  55

AAC AAA ATT AAT GAT GGT TAT CTT ACT GGT ATG GGA ATT ACA GCT ATA        303
Asn Lys Ile Asn Asp Gly Tyr Leu Thr Gly Met Gly Ile Thr Ala Ile
     60                  65                  70

TGG ATT TCG CAA CCT GTA GAA AAC ATT TAC GCA GTT TTG CCA GAT TCC        351
Trp Ile Ser Gln Pro Val Glu Asn Ile Tyr Ala Val Leu Pro Asp Ser
 75                  80                  85                  90

ACT TTT GGC GGA AGC ACA TCC TAT CAT GGT TAC TGG GCA CGA GAC TTC        399
Thr Phe Gly Gly Ser Thr Ser Tyr His Gly Tyr Trp Ala Arg Asp Phe
                95                 100                 105
```

```
AAA AAG ACA AAT CCC TTT TTT GGA AGC TTT ACA GAT TTT CAA AAT CTC        447
Lys Lys Thr Asn Pro Phe Phe Gly Ser Phe Thr Asp Phe Gln Asn Leu
            110                 115                 120

ATA GCA ACA GCT CAT GCT CAC AAT ATA AAA GTT ATA ATA GAC TTT GCA        495
Ile Ala Thr Ala His Ala His Asn Ile Lys Val Ile Ile Asp Phe Ala
        125                 130                 135

CCA AAT CAT ACA TCT CCT GCA TCA GAG ACA GAC CCT ACC TAT GGG GAA        543
Pro Asn His Thr Ser Pro Ala Ser Glu Thr Asp Pro Thr Tyr Gly Glu
    140                 145                 150

AAT GGT AGA TTA TAT GAC AAT GGA GTA TTA CTT GGT GGT TAT ACC AAT        591
Asn Gly Arg Leu Tyr Asp Asn Gly Val Leu Leu Gly Gly Tyr Thr Asn
155                 160                 165                 170

GAT ACA AAT GGA TAT TTC CAT CAT TAT GGA GGA ACT AAT TTT TCA TCA        639
Asp Thr Asn Gly Tyr Phe His His Tyr Gly Gly Thr Asn Phe Ser Ser
                175                 180                 185

TAT GAA GAT GGA ATT TAC CGT AAT TTA TTT GAC TTA GCA GAT TTA GAT        687
Tyr Glu Asp Gly Ile Tyr Arg Asn Leu Phe Asp Leu Ala Asp Leu Asp
            190                 195                 200

CAG CAG AAT AGC ACT ATT GAT TCA TAT TTA AAA GCG GCA ATT AAA CTA        735
Gln Gln Asn Ser Thr Ile Asp Ser Tyr Leu Lys Ala Ala Ile Lys Leu
        205                 210                 215

TGG TTA GAC ATG GGG ATT GAT GGT ATA CGC ATG GAT GCA GTC AAA CAC        783
Trp Leu Asp Met Gly Ile Asp Gly Ile Arg Met Asp Ala Val Lys His
    220                 225                 230

ATG GCA TTT GGA TGG CAA AAG AAC TTT ATG GAT TCT ATT TTA AGT TAT        831
Met Ala Phe Gly Trp Gln Lys Asn Phe Met Asp Ser Ile Leu Ser Tyr
235                 240                 245                 250

AGA CCA GTT TTT ACA TTT GGC GAG TGG TAC CTT GGA ACC AAT GAA GTA        879
Arg Pro Val Phe Thr Phe Gly Glu Trp Tyr Leu Gly Thr Asn Glu Val
                255                 260                 265

GAT CCT AAT AAT AGG TAT TTT GCA AAT GAA AGT GGT ATG AGC CTT CTT        927
Asp Pro Asn Asn Thr Tyr Phe Ala Asn Glu Ser Gly Met Ser Leu Leu
            270                 275                 280

GAT TTT AGA TTT GCT CAA AAA GTT CGT CAA GTA TTC AGA GAC AAT ACA        975
Asp Phe Arg Phe Ala Gln Lys Val Arg Gln Val Phe Arg Asp Asn Thr
        285                 290                 295

GAC ACT ATG TAT GGA CTT GAT TCG ATG ATT CAG TCT ACT GCA GCA GAT       1023
Asp Thr Met Tyr Gly Leu Asp Ser Met Ile Gln Ser Thr Ala Ala Asp
    300                 305                 310

TAT AAT TTC ATA AAT GAT ATG GTT ACA TTT ATA GAT AAT CAT GAC ATG       1071
Tyr Asn Phe Ile Asn Asp Met Val Thr Phe Ile Asp Asn His Asp Met
315                 320                 325                 330

GAC AGA TTT TAT ACA GGA GGC AGT ACA CGG CCT GTT GAG CAA GCG TTA       1119
Asp Arg Phe Tyr Thr Gly Gly Ser Thr Arg Pro Val Glu Gln Ala Leu
                335                 340                 345

GCA TTT ACT TTA ACT TCT CGC GGT GTA CCT GCT ATA TAT TAC GGT ACA       1167
Ala Phe Thr Leu Thr Ser Arg Gly Val Pro Ala Ile Tyr Tyr Gly Thr
            350                 355                 360

GAG CAA TAT ATG ACA GGT AAT GGA GAC CCT TAT AAT AGA GCT ATG ATG       1215
Glu Gln Tyr Met Thr Gly Asn Gly Asp Pro Tyr Asn Arg Ala Met Met
        365                 370                 375
```

```
ACG TCA TTT GAC ACC ACA ACG ACG GCA TAT AAT GTG ATA AAA AAG CTT      1263
Thr Ser Phe Asp Thr Thr Thr Thr Ala Tyr Asn Val Ile Lys Lys Leu
    380                 385                 390

GCT CCA CTG CGT AAA TCT AAC CCT GCA ATT GCT TAC GGT ACA CAA AAA      1311
Ala Pro Leu Arg Lys Ser Asn Pro Ala Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Lys
395                 400                 405                 410

CAG CGA TGG ATA AAT AAT GAT GTT TAC ATT TAT GAA AGA CAA TTT GGT      1359
Gln Arg Trp Ile Asn Asn Asp Val Tyr Ile Tyr Glu Arg Gln Phe Gly
                415                 420                 425

AAT AAC GTT GCT CTT GTT GCT ATT AAT CGT AAT CTT TCA ACG AGC TAT      1407
Asn Asn Val Ala Leu Val Ala Ile Asn Arg Asn Leu Ser Thr Ser Tyr
            430                 435                 440

TAC ATT ACC GGC TTG TAC ACC GCA TTG CCT GCG GGA ACA TAT TCT GAC      1455
Tyr Ile Thr Gly Leu Tyr Thr Ala Leu Pro Ala Gly Thr Tyr Ser Asp
        445                 450                 455

ATG CTT GGC GGA TTA TTA AAT GGC AGT AGT ATT ACA GTA TCT AGT AAT      1503
Met Leu Gly Gly Leu Leu Asn Gly Ser Ser Ile Thr Val Ser Ser Asn
    460                 465                 470

GGT TCT GTA ACA CCG TTT ACC CTT GCG CCT GGT GAA GTT GCA GTA TGG      1551
Gly Ser Val Thr Pro Phe Thr Leu Ala Pro Gly Glu Val Ala Val Trp
475                 480                 485                 490

CAG TAT GTC AGT ACA ACT AAT CCT CCA TTG ATA GGA CAT GTA GGA CCG      1599
Gln Tyr Val Ser Thr Thr Asn Pro Pro Leu Ile Gly His Val Gly Pro
                495                 500                 505

ACA ATG ACA AAG GCA GGG CAG ACT ATA ACC ATA GAT GGA AGG GGA TTT      1647
Thr Met Thr Lys Ala Gly Gln Thr Ile Thr Ile Asp Gly Arg Gly Phe
            510                 515                 520

GGC ACA ACA GCA GGT CAA GTA TTA TTT GGG ACA ACT CCT GCA ACT ATT      1695
Gly Thr Thr Ala Gly Gln Val Leu Phe Gly Thr Thr Pro Ala Thr Ile
        525                 530                 535

GTG TCA TGG GAA GAT ACT GAA GTA AAA GTA AAA GTT CCT GCT TTA ACT      1743
Val Ser Trp Glu Asp Thr Glu Val Lys Val Lys Val Pro Ala Leu Thr
    540                 545                 550

CCT GGA AAA TAT AAC ATT ACA TTA AAA ACA GCA TCA GGA GTT ACA AGC      1791
Pro Gly Lys Tyr Asn Ile Thr Leu Lys Thr Ala Ser Gly Val Thr Ser
555                 560                 565                 570

AAT AGC TAT AAC AAT ATC AAT GTT TTA ACG GGA AAT CAG GTA TGT GTT      1839
Asn Ser Tyr Asn Asn Ile Asn Val Leu Thr Gly Asn Gln Val Cys Val
                575                 580                 585

AGA TTT GTA GTA AAT AAT GCT ACA ACC GTG TGG GGA GAA AAT GTA TAT      1887
Arg Phe Val Val Asn Asn Ala Thr Thr Val Trp Gly Glu Asn Val Tyr
            590                 595                 600

CTT ACG GGC AAT GTA GCT GAA CTT GGC AAC TGG GAT ACA TCG AAG GCA      1935
Leu Thr Gly Asn Val Ala Glu Leu Gly Asn Trp Asp Thr Ser Lys Ala
        605                 610                 615

ATA GGA CCA ATG TTT AAC CAG GTT GTG TAT CAA TAT CCT ACG TGG TAT      1983
Ile Gly Pro Met Phe Asn Gln Val Val Tyr Gln Tyr Pro Thr Trp Tyr
    620                 625                 630

TAC GAT GTA AGT GTG CCT GCT GGT ACT ACT ATA GAG TTT AAG TTT ATA      2031
Tyr Asp Val Ser Val Pro Ala Gly Thr Thr Ile Glu Phe Lys Phe Ile
635                 640                 645                 650
```

```
AAG AAA AAT GGT AGT ACT GTA ACC TGG GAA GGT GGA TAC AAC CAC GTA      2079
Lys Lys Asn Gly Ser Thr Val Thr Trp Glu Gly Gly Tyr Asn His Val
                655                 660                 665

TAT ACT ACA CCC ACT TCT GGT ACA GCT ACT GTA ATT GTA GAC TGG CAA      2127
Tyr Thr Thr Pro Thr Ser Gly Thr Ala Thr Val Ile Val Asp Trp Gln
            670                 675                 680

CCG TGA                                                              2133
Pro
```

（２）配列番号：２の情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）配列の長さ：683アミノ酸

（Ｂ）配列の型：アミノ酸

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ii）分子の型：タンパク質

（xi）配列の記載：配列番号：２

```
Ala Pro Asp Thr Ser Val Ser Asn Val Val Asn Tyr Ser Thr Asp Val
  1               5                  10                  15

Ile Tyr Gln Ile Val Thr Asp Arg Phe Leu Asp Gly Asn Pro Ser Asn
             20                  25                  30

Asn Pro Thr Gly Asp Leu Tyr Asp Pro Thr His Thr Ser Leu Lys Lys
         35                  40                  45

Tyr Phe Gly Gly Asp Trp Gln Gly Ile Ile Asn Lys Ile Asn Asp Gly
     50                  55                  60

Tyr Leu Thr Gly Met Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile Ser Gln Pro Val
 65                  70                  75                  80

Glu Asn Ile Tyr Ala Val Leu Pro Asp Ser Thr Phe Gly Gly Ser Thr
                 85                  90                  95

Ser Tyr His Gly Tyr Trp Ala Arg Asp Phe Lys Lys Thr Asn Pro Phe
            100                 105                 110

Phe Gly Ser Phe Thr Asp Phe Gln Asn Leu Ile Ala Thr Ala His Ala
        115                 120                 125

His Asn Ile Lys Val Ile Ile Asp Phe Ala Pro Asn His Thr Ser Pro
    130                 135                 140

Ala Ser Glu Thr Asp Pro Thr Tyr Gly Glu Asn Gly Arg Leu Tyr Asp
145                 150                 155                 160

Asn Gly Val Leu Leu Gly Gly Tyr Thr Asn Asp Thr Asn Gly Tyr Phe
                165                 170                 175

His His Tyr Gly Gly Thr Asn Phe Ser Ser Tyr Glu Asp Gly Ile Tyr
            180                 185                 190
```

```
Arg Asn Leu Phe Asp Leu Ala Asp Leu Asp Gln Gln Asn Ser Thr Ile
        195                 200                 205

Asp Ser Tyr Leu Lys Ala Ala Ile Lys Leu Trp Leu Asp Met Gly Ile
    210                 215                 220

Asp Gly Ile Arg Met Asp Ala Val Lys His Met Ala Phe Gly Trp Gln
225                 230                 235                 240

Lys Asn Phe Met Asp Ser Ile Leu Ser Tyr Arg Pro Val Phe Thr Phe
                245                 250                 255

Gly Glu Trp Tyr Leu Gly Thr Asn Glu Val Asp Pro Asn Asn Thr Tyr
            260                 265                 270

Phe Ala Asn Glu Ser Gly Met Ser Leu Leu Asp Phe Arg Phe Ala Gln
        275                 280                 285

Lys Val Arg Gln Val Phe Arg Asp Asn Thr Asp Thr Met Tyr Gly Leu
    290                 295                 300

Asp Ser Met Ile Gln Ser Thr Ala Ala Asp Tyr Asn Phe Ile Asn Asp
305                 310                 315                 320

Met Val Thr Phe Ile Asp Asn His Asp Met Asp Arg Phe Tyr Thr Gly
                325                 330                 335

Gly Ser Thr Arg Pro Val Glu Gln Ala Leu Ala Phe Thr Leu Thr Ser
            340                 345                 350

Arg Gly Val Pro Ala Ile Tyr Tyr Gly Thr Glu Gln Tyr Met Thr Gly
        355                 360                 365

Asn Gly Asp Pro Tyr Asn Arg Ala Met Met Thr Ser Phe Asp Thr Thr
    370                 375                 380

Thr Thr Ala Tyr Asn Val Ile Lys Lys Leu Ala Pro Leu Arg Lys Ser
385                 390                 395                 400

Asn Pro Ala Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Lys Gln Arg Trp Ile Asn Asn
                405                 410                 415

Asp Val Tyr Ile Tyr Glu Arg Gln Phe Gly Asn Asn Val Ala Leu Val
            420                 425                 430

Ala Ile Asn Arg Asn Leu Ser Thr Ser Tyr Tyr Ile Thr Gly Leu Tyr
        435                 440                 445

Thr Ala Leu Pro Ala Gly Thr Tyr Ser Asp Met Leu Gly Gly Leu Leu
    450                 455                 460

Asn Gly Ser Ser Ile Thr Val Ser Ser Asn Gly Ser Val Thr Pro Phe
465                 470                 475                 480

Thr Leu Ala Pro Gly Glu Val Ala Val Trp Gln Tyr Val Ser Thr Thr
                485                 490                 495

Asn Pro Pro Leu Ile Gly His Val Gly Pro Thr Met Thr Lys Ala Gly
            500                 505                 510

Gln Thr Ile Thr Ile Asp Gly Arg Gly Phe Gly Thr Thr Ala Gly Gln
        515                 520                 525

Val Leu Phe Gly Thr Thr Pro Ala Thr Ile Val Ser Trp Glu Asp Thr
    530                 535                 540

Glu Val Lys Val Lys Val Pro Ala Leu Thr Pro Gly Lys Tyr Asn Ile
545                 550                 555                 560
```

```
Thr Leu Lys Thr Ala Ser Gly Val Thr Ser Asn Ser Tyr Asn Asn Ile
                565                 570                 575

Asn Val Leu Thr Gly Asn Gln Val Cys Val Arg Phe Val Val Asn Asn
            580                 585                 590

Ala Thr Thr Val Trp Gly Glu Asn Val Tyr Leu Thr Gly Asn Val Ala
        595                 600                 605

Glu Leu Gly Asn Trp Asp Thr Ser Lys Ala Ile Gly Pro Met Phe Asn
    610                 615                 620

Gln Val Val Tyr Gln Tyr Pro Thr Trp Tyr Tyr Asp Val Ser Val Pro
625                 630                 635                 640

Ala Gly Thr Thr Ile Glu Phe Lys Phe Ile Lys Lys Asn Gly Ser Thr
                645                 650                 655

Val Thr Trp Glu Gly Gly Tyr Asn His Val Tyr Thr Thr Pro Thr Ser
            660                 665                 670

Gly Thr Ala Thr Val Ile Val Asp Trp Gln Pro
        675                 680
```

10

【図１】

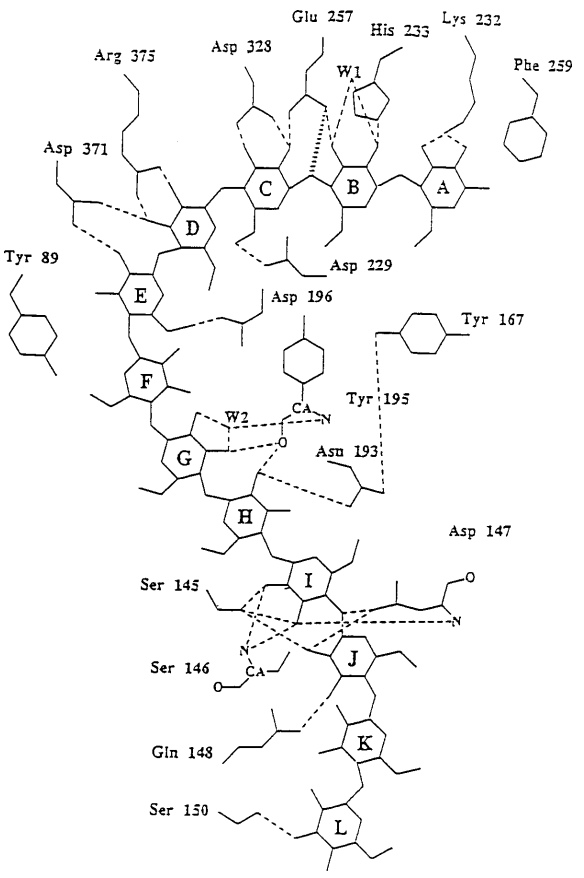

FIG. 1

【図２】

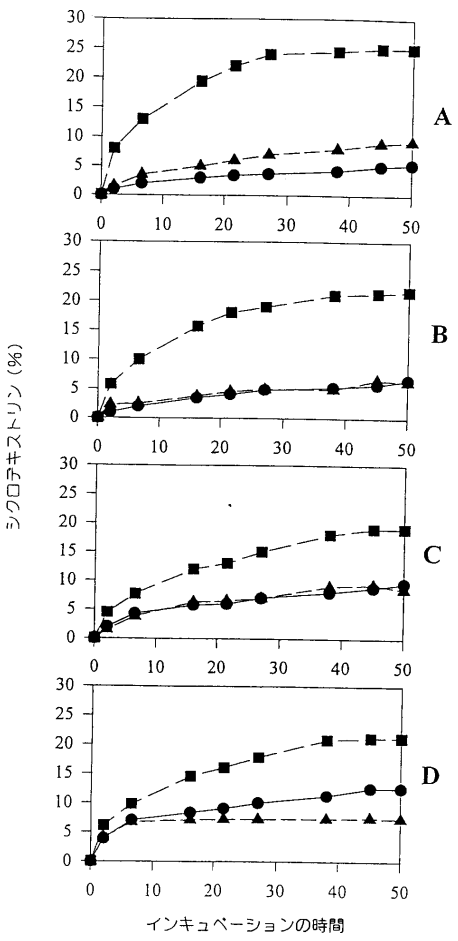

FIG. 2

【図３】

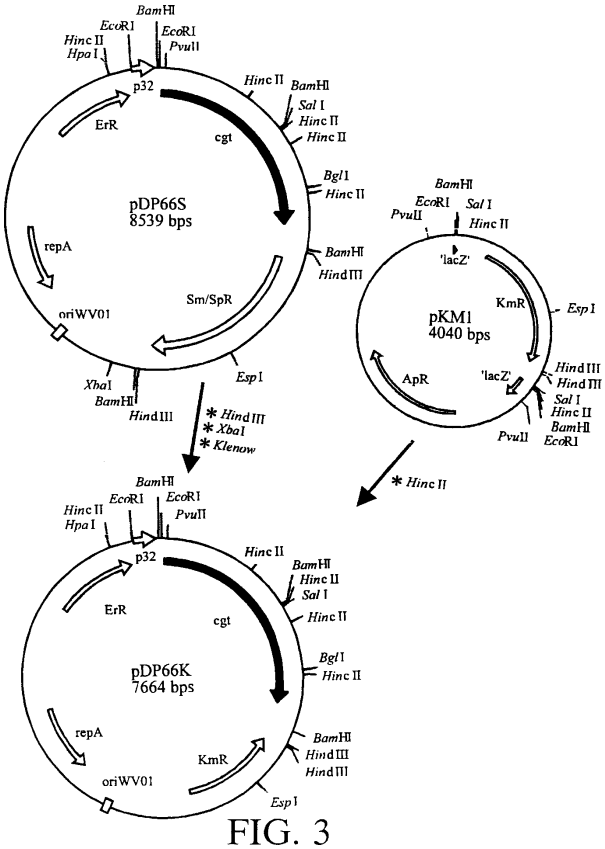

FIG. 3

【図４】

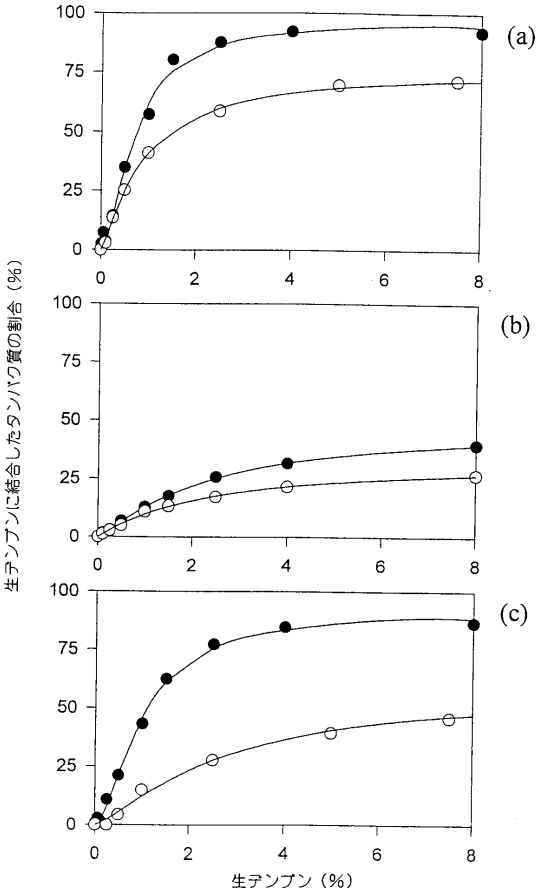

FIG. 4

【図５】

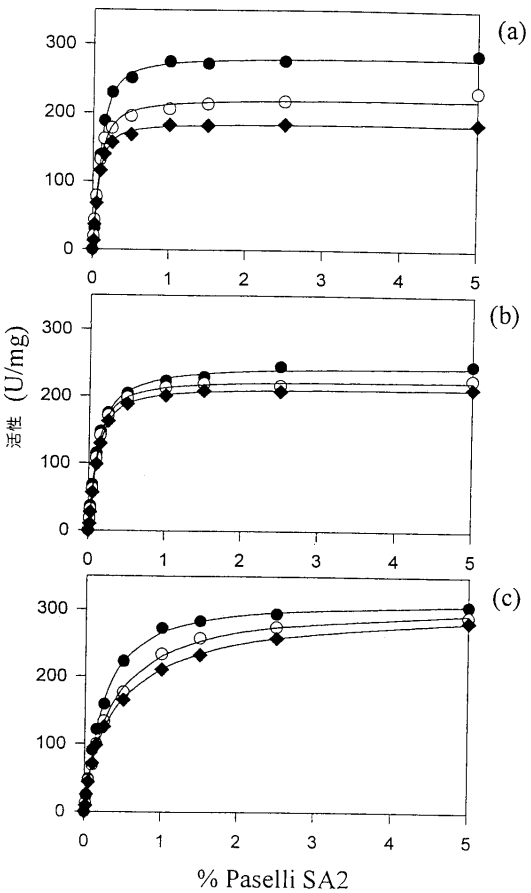

FIG. 5

【図６】

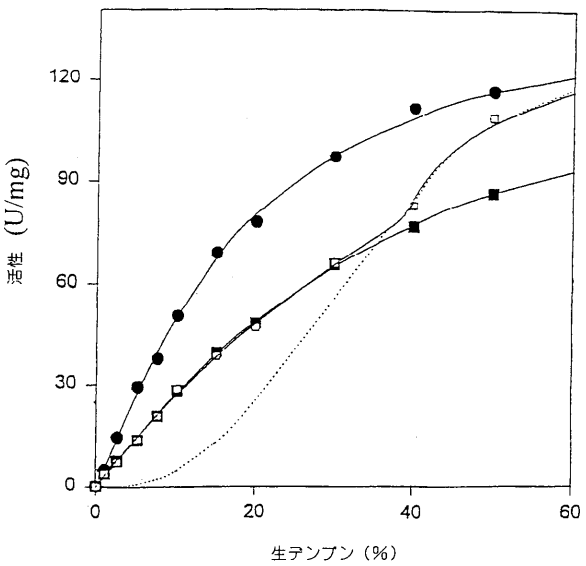

FIG. 6

【図７】

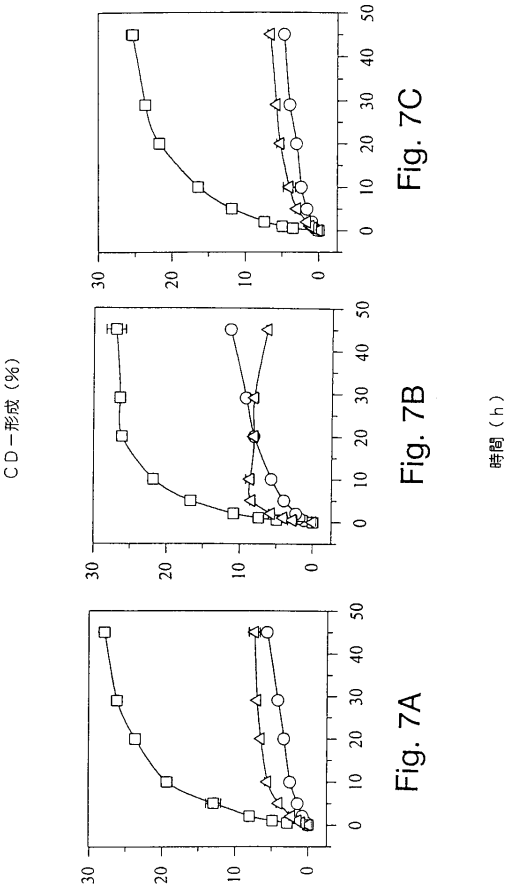

FIG. 7

【図８】

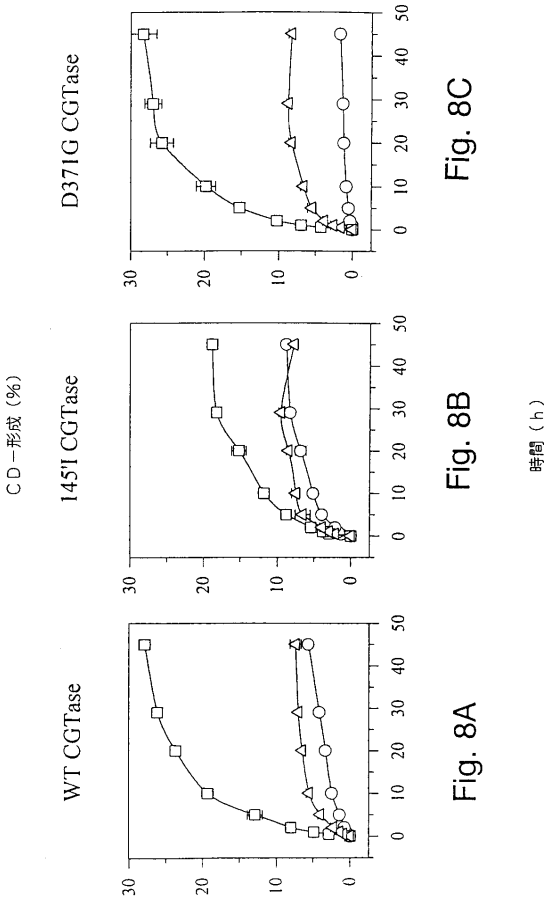

FIG. 8

【図９】

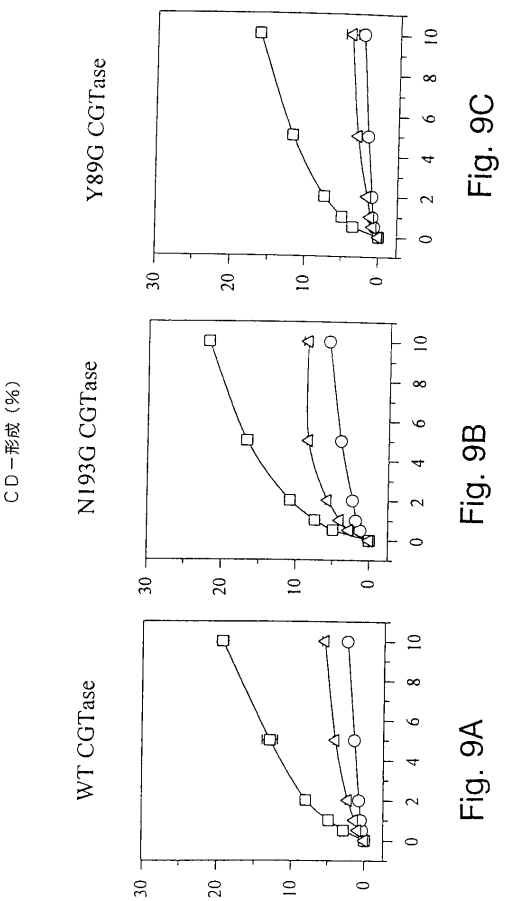

FIG. 9

【図１０】

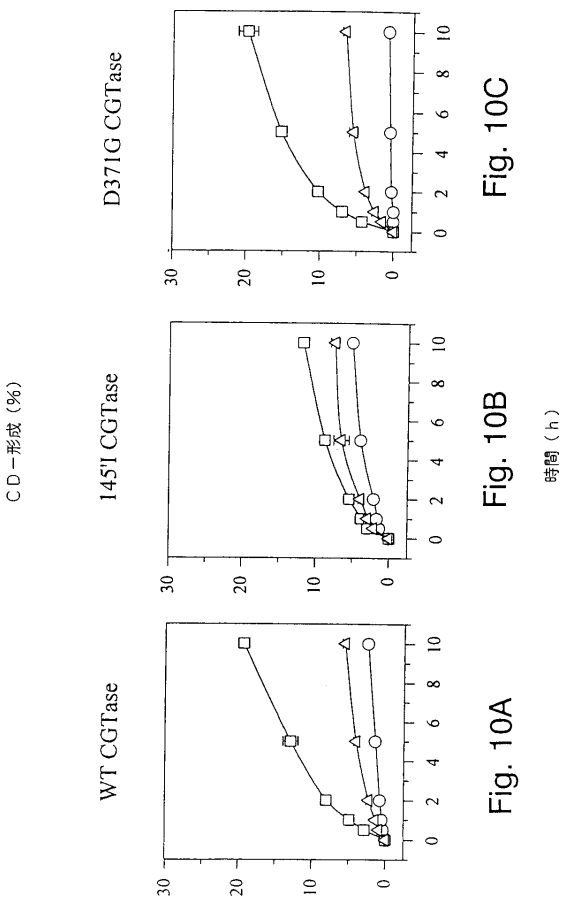

FIG. 10

フロントページの続き

(51)Int.Cl. FI
C12R 1/19 (2006.01) C12R 1:09
C12N 1/21
C12R 1:19
C12N 9/26 Z
C12R 1:09
C12N 9/26 Z
C12R 1:19

(31)優先権主張番号 1281/95
(32)優先日 平成7年11月16日(1995.11.16)
(33)優先権主張国 デンマーク(DK)

(74)代理人
弁理士 渡邉 陽一
(74)代理人
弁理士 西山 雅也
(74)代理人
弁理士 樋口 外治
(72)発明者 デイクフイゼン, ルベルト
オランダ国, エヌエル－９７１２ セーペー グロニンゲン, ブルールストラート 5, ユニベルシティ オフ グロニンゲン
(72)発明者 デイクストラ, バウケ ウェー.
オランダ国, エヌエル－９７１２ セーペー グロニンゲン, ブルールストラート 5, ユニベルシティ オフ グロニンゲン
(72)発明者 アンデルセン, カールステン
デンマーク国, デーコー－２８８０ バグスバエルト, ノボ アレ, ノボ ノルディスク アクティーゼルスカブ
(72)発明者 ヴォン デル オステン, クラウス
デンマーク国, デーコー－２８８０ バグスバエルト, ノボ アレ, ノボ ノルディスク アクティーゼルスカブ

審査官 福間 信子

(56)参考文献 J. Biotechnol., １９９４年, vol.32, no.3, p.283-288
J. Bacteriol., １９９２年, vol.174, no.22, p.7478-7481
Biochemistry, １９９４年, vol.33, no.33, p.9929-9936
J. Mol. Biol., １９９４年, vol.236, no.2, p.590-600

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12N 15/00 - 90
BIOSIS/WPIDS(STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/Geneseq
PubMed