

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4426716号
(P4426716)

(45) 発行日 平成22年3月3日(2010.3.3)

(24) 登録日 平成21年12月18日(2009.12.18)

| | | | |
|---------------|-----------|---------------|---------|
| (51) Int.Cl. | | F I | |
| C 1 2 N 15/09 | (2006.01) | C 1 2 N 15/00 | Z N A A |
| C 1 2 N 9/28 | (2006.01) | C 1 2 N 9/28 | |
| C 1 2 N 1/15 | (2006.01) | C 1 2 N 1/15 | |
| C 1 2 N 1/19 | (2006.01) | C 1 2 N 1/19 | |
| C 1 2 N 1/21 | (2006.01) | C 1 2 N 1/21 | |

請求項の数 5 (全 46 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|-----------|-------------------------------|-----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願2000-310605 (P2000-310605) | (73) 特許権者 | 000000918 花王株式会社 東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番1 〇号 |
| (22) 出願日 | 平成12年10月11日(2000.10.11) | (74) 代理人 | 110000084 特許業務法人アルガ特許事務所 |
| (65) 公開番号 | 特開2002-112792 (P2002-112792A) | (74) 代理人 | 100068700 弁理士 有賀 三幸 |
| (43) 公開日 | 平成14年4月16日(2002.4.16) | (74) 代理人 | 100077562 弁理士 高野 登志雄 |
| 審査請求日 | 平成18年8月3日(2006.8.3) | (74) 代理人 | 100096736 弁理士 中嶋 俊夫 |
| 微生物の受託番号 | FERM BP-3048 | (74) 代理人 | 100101317 弁理士 的場 ひろみ |
| 微生物の受託番号 | FERM BP-6946 | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高生産性α-アミラーゼ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の i) ~ iv) :

i) 配列番号2に示されるアミノ酸配列、

ii) 配列番号2に示されるアミノ酸配列の190番目のAsnをPhe、209番目のGlnをValに置換し、更に1番目のAspから19番目のGlyまでの配列を配列番号1に示されるアミノ酸配列の1番目のHisから21番目のGlyまでの配列に置換したアミノ酸配列、

iii) 配列番号2に示されるアミノ酸配列の167番目のGlnをGlu、169番目のTyrをLys、190番目のAsnをPhe、209番目のGlnをValに置換し、更に1番目のAspから19番目のGlyまでの配列を配列番号1に示されるアミノ酸配列の1番目のHisから21番目のGlyまでの配列に置換したアミノ酸配列、

iv) 配列番号2に示されるアミノ酸配列の167番目のGlnをGlu、169番目のTyrをLys、190番目のAsnをPhe、209番目のGlnをValに置換したアミノ酸配列、

の何れかのアミノ酸配列からなる - アミラーゼにおいて、該アミノ酸配列の128番目のAsp、140番目のGly、168番目のArg、181番目のAsn、272番目のPhe、434番目のTrp及び466番目のGluのうちのいずれかのアミノ酸残基の1残基以上を置換させてなる変異 - アミラーゼであって、当該アミノ酸残基の置換が、配列番号2のアミノ酸配列の128番目のAspをVal若しくはGlnに、140番

10

20

目のG l yをS e rに、1 6 8番目のA r gをG l nに、1 8 1番目のA s nをV a lに、2 7 2番目のP h eをS e rに、4 3 4番目のT r pをA r gに、又は4 6 6番目のG l uをA s pに置換させるものである変異 - アミラーゼ。

【請求項2】

請求項1記載の変異 - アミラーゼをコードする遺伝子又は当該遺伝子を含有するベクター。

【請求項3】

請求項2に記載のベクターで形質転換された細胞。

【請求項4】

請求項3に記載の形質転換細胞を培養することを特徴とする変異 - アミラーゼの製造方法。 10

【請求項5】

請求項1記載の変異 - アミラーゼを含有する洗浄剤組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、その生産性が向上した変異 - アミラーゼに関する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】

-アミラーゼ[EC.3.2.1.1]は、澱粉産業、醸造産業、繊維産業、医薬品産業及び食品産業等幅広い産業分野で利用されているが、中でも澱粉を高ランダムに分解できる -アミラーゼは、洗剤用として好ましく、従来、Bacillus licheniformis由来の -アミラーゼを始めとして、好アルカリ性Bacillus sp. KSM-AP1378 (FERM BP-3048) 株由来のアルカリ液化型 -アミラーゼ (W O 9 4 / 2 6 8 8 1号公報) やその耐熱性及び酸化剤耐性を向上させた改良型酵素 (W O 9 8 / 4 4 1 2 6号公報) 等が知られている。また最近、本発明者らは、好アルカリ性Bacillus sp. KSM-K38 (FERM BP-6946) 株由来のキレート剤・酸化剤耐性アルカリ液化型 -アミラーゼ (特願平10-362487、特願平10-362488) 及び更に耐熱性を向上させた改良型酵素を見出している (特願平11-163569)。 20

【0003】

一方、このような洗剤用酵素においては、工業的生産を考慮すると高生産性を有することも必要である。しかし、これまでの洗剤用 -アミラーゼは、タンパク工学技術を用いて耐熱性や酸化剤耐性等を向上させる改良は種々試みられているものの、生産性という点においては十分に検討されておらず、構造遺伝子を変異させて高生産化を図ることについても報告されていない。 30

【0004】

本発明は、優れた生産性を有する変異 -アミラーゼを提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、部位特異的変異により構築した変異 -アミラーゼ構造遺伝子を、微生物に導入し、 -アミラーゼの生産性を評価したところ、 -アミラーゼ遺伝子には生産性の向上に關与する部位が存在し、当該部位を変異させた組換え遺伝子を微生物に導入すればその生産性が飛躍的に向上した -アミラーゼが製造できることを見出した。 40

【0006】

すなわち本発明は、配列番号1に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列に対して60%以上の相同性を有する -アミラーゼにおいて、該アミノ酸配列の18番目のP r o、86番目のG l n、130番目のG l u、154番目のA s n、171番目のA r g、186番目のA l a、212番目のG l u、222番目のV a l、243番目のT y r、260番目のP r o、269番目のL y s、276番目のG l u、277番目のA s n、310番目のA r g、360番目のG l u、391番目のG l n、439番目のT r p、4 50

44番目のLys、471番目のAsn及び476番目のGlyのうちのいずれかに相当するアミノ酸残基の1残基以上を置換又は欠失させてなる変異 -アミラーゼを提供するものである。

【0007】

また本発明は、配列番号2に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列に対して60%以上の相同性を有する -アミラーゼにおいて、該アミノ酸配列の128番目のAsp、140番目のGly、144番目のSer、168番目のArg、181番目のAsn、207番目のGlu、272番目のPhe、375番目のSer、434番目のTrp及び466番目のGluのうちのいずれかに相当するアミノ酸残基の1残基以上を置換又は欠失させてなる変異 -アミラーゼを提供するものである。

10

【0008】

また本発明は、この変異 -アミラーゼをコードする遺伝子、該遺伝子を有するベクター、該ベクターで形質転換された細胞、該形質転換細胞を培養することを特徴とする変異 -アミラーゼの製造方法を提供するものである。

【0009】

更に本発明は、この変異 -アミラーゼを含有する洗浄剤組成物を提供するものである。

【0010】

【発明実施の形態】

本発明における高生産性変異 -アミラーゼとは、組換え微生物を培養することにより -アミラーゼを製造する場合において、その収率が変異前の酵素に比べて5%以上、好ましくは10%以上、更に好ましくは20%以上向上した -アミラーゼをいう。

20

【0011】

本発明の変異 -アミラーゼは、 -アミラーゼを構成するアミノ酸のうち生産性に関与するアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換又は欠失するように構築されたものであるが、ここで用いられる -アミラーゼとしては、例えば、Bacillus. amyloliquefaciens由来、Bacillus. licheniformis由来の液化型 -アミラーゼや好アルカリ性Bacillus属細菌由来の液化型アルカリ -アミラーゼ等が挙げられ、好ましくは配列番号1又は配列番号2に示したアミノ酸配列又は該アミノ酸配列に対して60%以上の相同性を有する -アミラーゼが挙げられる。

【0012】

ここで、配列番号1に示したアミノ酸配列又は該アミノ酸配列に対して60%以上の相同性を有する -アミラーゼとしては、具体的にはBacillus sp. KSM-AP1378 (FERM BP-3048)株由来のアルカリ液化型 -アミラーゼ(特開平8-336392号公報)、及びタンパク工学技術により構築した当該酵素の耐熱性や酸化剤耐性を向上させた改良酵素(WO98/44126号公報)が挙げられる。

30

また、配列番号2に示したアミノ酸配列又は該アミノ酸配列に対して60%以上の相同性を有する -アミラーゼとしては、Bacillus sp. KSM-K38 (FERM BP-6946)株由来のキレート剤・酸化剤耐性アルカリ液化型 -アミラーゼ(特願平10-362487、特願平10-362488)、及びタンパク工学技術により構築した当該酵素の耐熱性を向上させた改良酵素(特願平11-163569)が挙げられる。

40

【0013】

尚、アミノ酸配列の相同性はLipman-Pearson法(Science, 227, 1435, 1985)によって計算される。

【0014】

本発明の変異 -アミラーゼの取得は、まず -アミラーゼを生産する微生物より、当該 -アミラーゼをコードする遺伝子をクローニングするが、その方法は、一般的な遺伝子組換え技術を用いれば良く、例えば、特開平8-336392号公報に記載の方法を用いることができる。ここで、用いられる遺伝子としては、例えば配列番号1又は配列番号2で示されるアミノ酸配列をコードする配列番号3又は配列番号4に示されるものが挙げられる。また、得られた遺伝子に変異を与え耐熱性や酸化剤耐性を向上させた変異遺伝子も挙

50

げられる。

【0015】

次に得られた遺伝子に対して変異を与えるが、その方法としても一般的に行われている部位特異的変異の方法であればいずれも採用でき、例えば宝酒造社製のSite-Directed Mutagenesis System Mutan-Super Express Kmキット等を用いて行うことができる。

【0016】

本発明における高生産性 α -アミラーゼを得るための変異としては、例えば配列番号1に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列に対して60%以上の相同性を有する α -アミラーゼにおいて、該アミノ酸配列の18番目のPro、86番目のGln、130番目のGlu、154番目のAsn、171番目のArg、186番目のAla、212番目のGlu、222番目のVal、243番目のTyr、260番目のPro、269番目のLys、276番目のGlu、277番目のAsn、310番目のArg、360番目のGlu、391番目のGln、439番目のTrp、444番目のLys、471番目のAsn及び476番目のGlyのうちのいずれかに相当するアミノ酸残基の1残基以上、あるいは配列番号2に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列に対して60%以上の相同性を有する α -アミラーゼにおいて、該アミノ酸配列の128番目のAsp、140番目のGly、144番目のSer、168番目のArg、181番目のAsn、207番目のGlu、272番目のPhe、375番目のSer、434番目のTrp及び466番目のGluのうちのいずれかに相当するアミノ酸残基の1残基以上を置換又は欠失させることにより達成できるが、好ましくは、アミノ酸残基の置換が、配列番号1のアミノ酸配列の18番目のProに相当するアミノ酸残基をSer若しくはThr、86番目のGlnに相当するアミノ酸残基をGlu、130番目のGluに相当するアミノ酸残基をVal若しくはGln、154番目のAsnに相当するアミノ酸残基をAsp、171番目のArgに相当するアミノ酸残基をCys若しくはGln、186番目のAlaに相当するアミノ酸残基をVal若しくはAsn、212番目のGluに相当するアミノ酸残基をAsp、222番目のValに相当するアミノ酸残基をGlu、243番目のTyrに相当するアミノ酸残基をCys若しくはSer、260番目のProに相当するアミノ酸残基をGlu、269番目のLysに相当するアミノ酸残基をGln、276番目のGluに相当するアミノ酸残基をHis、277番目のAsnに相当するアミノ酸残基をSer若しくはPhe、310番目のArgに相当するアミノ酸残基をAla、360番目のGluに相当するアミノ酸残基をGln、391番目のGlnに相当するアミノ酸残基をGlu、439番目のTrpに相当するアミノ酸残基をArg、444番目のLysに相当するアミノ酸残基をArg、471番目のAsnに相当するアミノ酸残基をAsp若しくはGlu又は476番目のGlyに相当するアミノ酸残基をAspに置換させる変異、

【0017】

或いは、配列番号2のアミノ酸配列の128番目のAspに相当するアミノ酸残基をVal若しくはGln、140番目のGlyに相当するアミノ酸残基をSer、144番目のSerに相当するアミノ酸残基をPro、168番目のArgに相当するアミノ酸残基をGln、181番目のGlnに相当するアミノ酸残基をVal、207番目のGluに相当するアミノ酸残基をAsp、272番目のPheに相当するアミノ酸残基をSer、375番目のSerに相当するアミノ酸残基をPro、434番目のTrpに相当するアミノ酸残基をArg、又は466番目のGluに相当するアミノ酸残基をAspに置換させる変異が望ましい。

【0018】

ここで、配列番号1のアミノ酸配列における変異のうち、86番目のGlnに相当するアミノ酸残基をGlu、130番目のGluに相当するアミノ酸残基をVal若しくはGln、186番目のAlaに相当するアミノ酸残基をAsn、243番目のTyrに相当するアミノ酸残基をSer、260番目のProに相当するアミノ酸残基をGlu、269番目のLysに相当するアミノ酸残基をGln、277番目のAsnに相当するアミノ酸残基をPhe又は471番目のAsnに相当するアミノ酸残基をAsp若しくはGluに

10

20

30

40

50

置換させる変異は、同時に - アミラーゼの培養液或いはその濃縮脱塩液に対する溶解性を向上させることができる。具体的には、変異前に比べて濃縮脱塩液における4、1週間保存後の上清液の残存活性を5%以上、特に10%向上させることができる。従って、斯かるアミノ酸の変異を含む本発明の変異 - アミラーゼにおいては、高収率で高い濃度の発酵濃縮液を得ることができ、発酵生産後の限外濾過等の酵素製剤化処理も効率良く行うことができる。

【0019】

斯かるアミノ酸の変異は、各種アミノ酸残基の置換又は欠失から選ばれる2種以上の置換又は欠失を組み合わせた変異も有効である。また更に上記の変異に、酵素特性を改良する変異、例えば、配列番号1に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列に対して60%以上の相同性を有する - アミラーゼにおいて、該アミノ酸配列の181番目のArgと182番目のGlyに相当するアミノ酸残基を欠失させて耐熱性を向上させる変異、222番目のMetに相当するアミノ酸をThrに置換して酸化剤耐性を向上させる変異、484番目のLysに相当するアミノ酸残基をGlnに置換して溶解性を向上させる変更、配列番号2に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列に対して60%以上の相同性を有する - アミラーゼにおいて、該アミノ酸配列の107番目のMetに相当するアミノ酸残基をLeuに置換して酸化剤耐性を更に強化する変異、更に188番目のGluに相当するアミノ酸残基をIleに置換して衣料用洗剤における洗浄力を増強させる変異等と組み合わせることも可能である。

【0020】

このようにして得られた、変異 - アミラーゼ構造遺伝子を適当な制御遺伝子と適当なプラスミドベクターに適切に結合することによって生産用プラスミドが構築され、該プラスミドをプロトプラスト法(Mol. Gen. Genet., 168, 111, 1979)等により枯草菌、大腸菌等の微生物、好ましくは枯草菌に導入し、得られた組換え微生物を培養することにより、高い収率で変異 - アミラーゼを得ることができる。

【0021】

かくして得られた変異 - アミラーゼは、後記実施例に示すように、酵素のもつ生化学的性質を保持したままその生産性が約10~約500%或いはそれ以上に向上するという優れた性質を有する。従って、耐熱性、キレート剤耐性及び酸化剤耐性、高溶解性等を有する洗浄剤組成物に適したアルカリ液化型 - アミラーゼについて本発明に示したアミノ酸残基の変異を施せば、これらの性質を保持し且つ組換え微生物に於ける生産性が大幅に向上した有益な酵素を創製することができる。

【0022】

本発明の洗浄剤組成物は、本発明の - アミラーゼ以外に、更に枝切り酵素(例えばブルラナーゼ、イソアミラーゼ、ネオブルラナーゼなど)、 - グルコシダーゼ、グルコアミラーゼ、プロテアーゼ、セルラーゼ、リパーゼ、ペクチナーゼ、プロトペクチナーゼ、ペクチン酸リアーゼ、パーオキシダーゼ、ラッカーゼ及びカタラーゼから選ばれる1種又は2種以上の酵素を配合することができる。

【0023】

また、洗浄剤に通常配合されるアニオン界面活性剤、両性界面活性剤、ノニオン界面活性剤、カチオン界面活性剤等の界面活性剤、キレート剤、アルカリ剤、無機塩、再汚染防止剤、塩素捕捉剤、還元剤、漂白剤、蛍光染料可溶化剤、香料、ケーキング防止剤、酵素の活性化剤、酸化防止剤、防腐剤、色素、青味付け剤、漂白活性化剤、酵素安定化剤、調節剤等を配合することができる。

【0024】

本発明の洗浄剤組成物は、上記方法で得られる高生産性 - アミラーゼ及び上記公知の洗浄成分を組み合わせることで常法に従い、製造することができる。洗浄剤の形態は、用途に応じて選択することができ、例えば、液体、粉末、顆粒等とすることができる。また、本発明の洗浄剤組成物は、衣料用洗浄剤、漂白洗浄剤、自動食器洗浄機用洗浄剤、配水管洗浄剤、義歯洗浄剤等として使用できるが、特に衣料用洗浄剤、漂白洗浄剤、自動食器洗浄機用洗

10

20

30

40

50

浄剤として好適に使用することができる。

【0025】

また、本発明における高生産性を有する変異 - アミラーゼは、澱粉液化・糖化用組成物として用いることができ、更にグルコアミラーゼ、マルターゼ、プルラナーゼ、イソアミラーゼ、ネオプルラナーゼ、などから選ばれる1種又は2種以上の酵素を配合し、変異 - アミラーゼとともに澱粉に作用させることもできる。

【0026】

更に、本発明の変異 - アミラーゼは、繊維の糊抜き剤組成物として用いることができ、プルラナーゼ、イソアミラーゼ若しくはネオプルラナーゼ等の酵素を共に配合することもできる。

10

【0027】

【実施例】

アミラーゼ活性及びタンパク質量の測定

組換え枯草菌により生産させた各酵素のアミラーゼ活性及びタンパク質量は以下に示す方法で行った。

アミラーゼ活性測定は、3,5-ジニトロサリチル酸法（DNS法）で測定した。40 mMグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液（pH 10）中に可溶性澱粉を含む反応液中、50 で15分間の反応を行った後、生成した還元糖をDNS法で定量することによって測定した。酵素の力価は1分間に1 μmol のグルコースに相当する還元糖を生成する酵素量を1単位とした。

蛋白量の測定は、牛血清アルブミンを標準として、Bio-Rad社製のProtein Assay Kitを用いて定量した。

20

【0028】

参考例1 アルカリ液化型アミラーゼのスクリーニング

土壌約0.5 gを滅菌水に懸濁し、80 で15分間加熱処理した。この熱処理液の上清を適当に滅菌水で希釈して、分離用寒天培地（培地A）に塗布した。次いで、これを30 で2日間培養し、集落を形成させた。集落の周に澱粉溶解に基づく透明帯を形成するものを選出し、これをアミラーゼ生産菌として分離した。更に、分離菌を培地Bに接種し、30 で2日間好氣的に振盪培養した。培養後、遠心分離した上清液について、キレート剤（EDTA）耐性能を測定し、更に最適作用pHを測定して、Bacillus sp.KSM-K38（FERM BP-6946）株を取得した。

30

【0029】

| | | |
|-----|---------------------------------|------|
| 培地A | トリプトン | 1.5% |
| | ソイトン | 0.5% |
| | 塩化ナトリウム | 0.5% |
| | 着色澱粉 | 0.5% |
| | 寒天 | 1.5% |
| | Na ₂ CO ₃ | 0.5% |
| | (pH 10) | |

40

【0030】

| | | |
|-----|---------------------------------|------|
| 培地B | トリプトン | 1.5% |
| | ソイトン | 0.5% |
| | 塩化ナトリウム | 0.5% |
| | 可溶性澱粉 | 1.0% |
| | Na ₂ CO ₃ | 0.5% |
| | (pH 10) | |

【0031】

KSM-K38株の菌学的性質を表1に示す。

【0032】

【表1】

| KSM-K38株 | |
|---|---|
| (a)顕微鏡的観察結果 | 菌体の大きさは、K36株が1.0~1.2μm×2.4~5.4μm、K38株が1.0~1.2μm×1.8~3.8μmの桿菌であり、菌体の準端或いは中央に楕円形の内生孢子(1.0~1.2μm×1.2~1.4μm)を作る。周鞭毛を有し運動性がある。グラム染色は陽性。抗酸性はない。 |
| (b)各種培地に於ける生育状態 尚、本菌株は好アルカリ性のため以下の試験では、用いた培地に0.5%炭酸ナトリウムを添加した。 ・肉汁寒天平板培養 ・肉汁寒天斜面培養 ・肉汁液体培養 ・肉汁ゼラチン穿刺培養 ・リトマスミルク培地 | 生育状態は良い。集落の形状は円形である。表面は平滑、周縁はスムーズである。又、集落の色調は黄褐色である。 生育する。 生育する。 生育状態は良い。ゼラチンの液化は認められない。 変化しない。 |
| (c)生理学的性質 ・硝酸塩の還元及び脱窒反応 ・MRテスト ・V-Pテスト ・インドールの生成 ・硫化水素の生成 ・澱粉の加水分解 ・クエン酸の利用 ・無機窒素源の利用 ・色素の生成 ・ウレアーゼ ・オキシダーゼ ・カタラーゼ ・生育の範囲 ・酸素に対する態度 ・O-Fテスト ・糖の利用性 ・食塩含有培地に於ける生育 | 硝酸塩の還元は陽性。 脱窒反応は陰性。 培地がアルカリ性の為、判定できず。 陰性。 陰性。 陰性。 陽性。 クリステンセン培地で生育し、コーサー培地及びシモンズ培地では生育しない。 硝酸塩は利用するが、アンモニウム塩は利用しない。 陰性。 陰性。 陰性。 陽性。 生育の温度範囲は、15~40℃、生育最適温度は30℃である。 生育のpH範囲は、pH9.0~11.0、生育最適pHは同様である。 好氣的。 生育せず。 D-ガラクトース、D-キシロース、L-アラビノース、ラクトース、グリセリン、メリビオース、リボース、D-グルコース、D-マンノース、マルトース、シュクロース、トレハロース、D-マンニツト、澱粉、ラフィノース、及びD-フラクトースを利用する。 食塩濃度が12%では生育するが、15%では生育できない。 |

10

20

30

40

50

【0033】

参考例2 KSM-K38株の培養

参考例1の液体培地Bに、KSM-K38株を接種し、30℃で2日間好氣的に振盪培養した。遠心分離上清についてアミラーゼ活性(pH8.5)を測定した結果、培養液1L当たり、それぞれ1177Uの活性を有していた。

【0034】

参考例3 アルカリ液化型アミラーゼの精製

参考例2で得られたKSM-K38株の培養上清液に80%飽和濃度になるように硫酸アンモニウムを加えて攪拌後、生成した沈殿を回収し、2mM CaCl₂を含む10mM トリス塩酸緩衝液(pH7.5)に溶解し、同緩衝液に対して一晚透析した。得られた透析内液を同緩衝液で平衡化したDEAE-トヨパール650Mカラムに添着し、同緩衝液を用いて0-1Mの食塩の濃度勾配によりタンパクを溶出した。活性画分を同緩衝液にて透析後、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより得た活性画分を上記緩衝液にて透析することによってポリアクリルアミドゲル電気泳動(ゲル濃度10%)及びソディウムドデシル硫酸(SDS)電気泳動で単一のバンドを与える精製酵素を得ることができた。

【0035】

参考例4 酵素特性

精製酵素の特性は以下の通りである。

(1) 作用

澱粉、アミロース、アミロペクチン及びそれらの部分分解物のα-1,4グルコシド結合を分解し、アミロースからはグルコース(G1)、マルトース(G2)、マルトトリオース(G3)、マルトテトラオース(G4)、マルトペンタオース(G5)、マルトヘキサオース(G6)及びマルトヘプタオース(G7)を生成する。ただしプルランには作用しない。

(2) pH安定性(ブリットン-ロビンソン緩衝液)

40℃、30分間処理条件下で、pH6.5~11.0の範囲で70%以上の残存活性を示す。

(3) 作用温度範囲及び最適作用温度

20~80℃の広範囲で作用し、最適作用温度は50~60℃である。

(4) 温度安定性

50mMグリシン水酸化ナトリウム緩衝液(pH10)中にて温度を変化させ、各温度で30分間処理することにより失活の条件を調べると、40℃で80%以上の残存活性を示し、45℃でも約60%の残存活性を示した。

(5) 分子量

ソディウムドデシル硫酸ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により測定した分子量は55,000±5,000である。

(6) 等電点

等電点電気泳動法により測定した等電点は4.2付近である。

(7) 界面活性剤の影響

直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム、アルキル硫酸エステルナトリウム塩、ポリオキシエチレンアルキル硫酸エステルナトリウム塩、α-オレフィンスルホン酸ナトリウム、β-スルホン化脂肪酸エステルナトリウム、アルキルスルホン酸ナトリウム、SDS、石鹼及びソフタノール等の各種界面活性剤0.1%溶液中で、pH10、30℃で30分間処理しても、殆ど活性阻害を受けない(活性残存率90%以上)。

(8) 金属塩の影響

各種金属塩と共存させて、pH10、30℃で30分間処理してその影響を調べたところ、1mMのMn²⁺により阻害され(阻害率約75%)、1mMのSr²⁺及びCd²⁺により若干阻害される(阻害率約30%)。

【0036】

実施例1 -アミラーゼ遺伝子を結合した各種組換えプラスミドの調製

10

20

30

40

50

WO 98 / 44126号公報に記載された方法を用いて、*Bacillus* sp. KSM-AP1378 (FERM BP-3048) 株由来であり、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する - アミラーゼ (以下、LAMYと記載) の181番目のArgと182番目のGlyを欠失させることによって耐熱性が向上した変異 - アミラーゼ (以下、RGと記載) 及びこの欠失変異に加えて配列番号1のアミノ酸配列の202番目のMetをThrに置換させることによって、耐熱性に加えて酸化剤耐性が向上した変異 - アミラーゼ (以下、RG/M202Tと記載) をそれぞれコードする遺伝子を構築した。それぞれの遺伝子を鋳型とし、プライマーLAUS (配列番号5) とLADH (配列番号6) を用いたPCR反応によって、各変異 - アミラーゼをコードする遺伝子断片 (約1.5kb) をそれぞれ増幅した。これらを制限酵素SalIによって切断後、発現ベクターpHSP64 (特開平6-217781号公報) のSalI-SmaI部位に挿入することによって、*Bacillus* sp. KSM-64 (FERM P-10482) 株のアルカリセルラーゼ遺伝子に由来する強力プロモーターの下流に、各変異 - アミラーゼの構造遺伝子が結合した組換えプラスミドを構築した。

【0037】

一方、*Bacillus* sp. KSM-K38 (FERM BP-6946) 株の菌体からSaitoとMiuraの方法 (Biochim. Biophys. Acta, 72, 619, 1961) の方法によって抽出した染色体DNAを鋳型とし、表2に示したプライマーK38US (配列番号7) 及びK38DH (配列番号8) を用いてPCR反応を行うことによって、配列番号2に示されるアミノ酸配列を有する - アミラーゼ (以下、K38AMYと記載) をコードする構造遺伝子断片 (約1.5kb) を増幅した。これを制限酵素SalIによって切断後、発現ベクターpHSP64のSalI-SmaI部位に挿入することによって、pHSP64に含まれる*Bacillus* sp. KSM-64 (FERM P-10482) 株のアルカリセルラーゼ遺伝子に由来する強力プロモーターの下流に、K38AMYの構造遺伝子が結合した組換えプラスミドを構築した (図1)。本組換えプラスミドを鋳型とし、表2に示したプライマーCLUBG (配列番号9) とK38DH (配列番号8) を用いたPCR反応を行うことによって、強力プロモーターとK38AMYが結合した遺伝子断片 (約2.1kb) を増幅した。

また、以下に示す組換えPCR法によって、K38AMYとLAMYとの間のキメラ - アミラーゼをコードする遺伝子を構築した。即ち、KSM-K38 (FERM BP-6946) 株の染色体DNAを鋳型とし、表2に示したプライマーK38DH (配列番号8) 及びLA-K38 (配列番号10) を用いてPCR反応を行うことによって、配列番号2に示されるK38AMYのアミノ酸配列のGln20からC末下流までの配列をコードする断片を増幅した。また、LAMY遺伝子と強力プロモーターを含む前述の組換えプラスミドを鋳型とし、表2に示したプライマーCLUBG (配列番号9) とLA-K38R (配列番号11) を用いたPCR反応によって、強力プロモーターの上流から、配列番号1のLAMYのアミノ酸配列のGly21までをコードする遺伝子断片を増幅させた。次に、得られた両DNA断片と表2に示したプライマーCLUBG (配列番号9) とK38DH (配列番号8) を用いた2回目のPCR反応を行うことによって、末端にLA-K38 (配列番号10) 及びLA-K38R (配列番号11) プライマーに由来する相補的な配列を持つ両断片が結合し、強力プロモーターの下流にLAMYのHis1からGly21までをコードする領域に続いてK38AMYのGln20以降C末までをコードする領域が結合したキメラ - アミラーゼ (以下、LA-K38AMYと記載) をコードする遺伝子断片 (約2.1kb) を増幅した。

更に、宝酒造社のSite-Directed Mutagenesis System Mutan-Super Express Kmキットを用いて、K38AMY及びLA-K38AMYに以下の変異を導入した。まず、上述のK38AMY及びLA-K38AMY遺伝子断片 (約2.1kb) を同キットに付属のプラスミドベクターpKF19kのSmaI部位に挿入し、変異導入用組換えプラスミドを構築した (図2)。次に、表2に示した部位特異的変異導入用オリゴヌクレオチドプライマーN190F (配列番号50) をT4DNAキナーゼによって5'リン酸化した後、これと上記の変異導入用組換えプラスミドを用いて、キットの方法に従って変異導入反応を行い、反応産物によって大腸菌MV1184株 (コンピテントセルMV1184、宝酒造社製) の形質転換を

10

20

30

40

50

行った。この結果から得られた形質転換体から組換えプラスミドを抽出し、塩基配列の解析を行って190番目のAsnがPheに置換した変異の確認を行った。また、変異導入した遺伝子に対して、上記と同様にして、A209Vプライマー（配列番号51）、次いで、QEYKプライマー（配列番号49）を用いて繰り返し変異導入反応を行うことによって、配列番号2に示されるK38AMYのアミノ酸配列の190番目のAsnをPhe、209番目のGlnをValに置換し、更に1番目のAspから19番目のGlyまでの配列を配列番号1に示されるLAM Yのアミノ酸配列の1番目のHisから21番目のGlyまでの配列に置換することによって耐熱性が向上した変異 - アミラーゼ（以下、LA-K38AMY/NFQVと記載）、K38AMYのアミノ酸配列の167番目のGlnをGlu、169番目のTyrをLys、190番目のAsnをPhe、209番目のGlnをValに置換し、更に1番目のAspから19番目のGlyまでの配列をLAM Yのアミノ酸配列の1番目のHisから21番目のGlyまでの配列に置換することによって耐熱性が飛躍的に向上した変異 - アミラーゼ（以下、LA-K38AMY/QEYK/NFQVと記載）、及びK38AMYのアミノ酸配列の167番目のGlnをGlu、169番目のTyrをLys、190番目のAsnをPhe、209番目のGlnをValに置換することによって耐熱性が向上した変異 - アミラーゼ（以下、QEYK/NFQVと記載）をそれぞれコードする遺伝子を構築した。

それぞれの遺伝子を鋳型とし、プライマーK38US（配列番号7）とK38DH（配列番号8）を用いたPCR反応によって、各変異 - アミラーゼをコードする構造遺伝子断片（約1.5kb）を増幅した。これを上記と同様に発現ベクターpHSP64のSalI-SmaI部位に挿入することによって、各変異 - アミラーゼの構造遺伝子が結合した組換えプラスミドを構築した（図1）。

【0038】

実施例2 - アミラーゼ生産性向上変異の導入

組換え枯草菌に於けるアミラーゼ生産性を向上させるための部位特異的変異導入には宝酒造社製のSite-Directed Mutagenesis System Mutan-Super Express Kmキットを用いた。

まず、実施例1で得られた各種組換えプラスミドを鋳型とし、RG及びRG/M202Tの場合はプライマーCLUBG（配列番号9）及びLADH（配列番号6）を、一方、K38AMY、LA-K38AMY/NFQV、LA-K38AMY/QEYK/NFQV及びQEYK/NFQVの場合はプライマーCLUBG（配列番号9）及びK38DH（配列番号8）を用いてそれぞれ、PCR反応を行うことによって、KSM-64株由来の強力プロモーターの上流から各種 - アミラーゼ遺伝子の下流までの約2.1kbの断片を増幅させ、これを上記キットに付属のプラスミドベクターpKF19kのSalI部位に挿入し、各種の変異導入用組換えプラスミドを構築した（図2）。

【0039】

次に、表2（配列番号12～51）に示した各種の部位特異的変異導入用オリゴヌクレオチドプライマーをT4DNAキナーゼによって5'リン酸化した後、これと上記の変異導入用組換えプラスミドを用いて、キットに記載の方法に従って変異導入反応を行い、反応産物によって大腸菌MV1184株（コンピテントセルMV1184、宝酒造社製）の形質転換を行った。この結果得られた形質転換体から組換えプラスミドを抽出し、塩基配列の解析を行って変異の確認を行った。

【0040】

【表2】

10

20

30

40

| 配列番号 | プライマー名 | 塩基配列 (5' -3') | 使用目的 | |
|------|---------|---|-------------------------|-------------------|
| 5 | LAUS | GAGTCGACCAGCACAAAGCCCATCATAATGG | 組換えPCR | |
| 6 | LADH | TAAAGCTTCAATTTATATTGG | | |
| 7 | K38US | GGGTCGACCAGCACAAAGCCGATGGATTGAACGGTACGATG | | |
| 8 | K38DH | TAAAGCTTTTGTATTGGTTCACGTACAC | | |
| 9 | CLUBG | CCAGATCTACTTACCATTTTAGAGTCA | | |
| 10 | LA-K38 | ATTTGCCAAATGACGGGAGCATTGGAATCGGTT | | |
| 11 | LA-K38R | AACCGATTCCAATGCTGCCCGTCATTGGCAAAT | | |
| 12 | P18S | TTTGAATGGCATTGTCAAATGACGGGAACCAC | | 部位特異的変異 (ΔRG用) |
| 13 | Q86E | ACAAGGAGTCAGTTGGAAGGTGCCGTGACATCT | | |
| 14 | E130V | CGAAACCAAGTAATATCAGGT | | |
| 15 | N154D | AATACCCATTCCGATTTTAAATGGCGC | | |
| 16 | R171C | GATTGGGATCAGTCATGYCAGCTTCAAGACAAA | | |
| 17 | A186V | AAATTCACCGAAAGGTATGGGACTGGGAAGTA | | |
| 18 | E212D | TCATCCAGATGTAATCAATG | | |
| 19 | V222E | CTTAGAAATGGGGAGAATGGTATACAATACA | | |
| 20 | Y243C | GTGAAACATATTAATGCAGCTATACGAGAGAT | | |
| 21 | P260E | AACACCACAGTAAAGAAATGTTGCAGTTGCA | | |
| 22 | K269Q | AGAATTTGGCAAATGACCT | | |
| 23 | E276H | TTGCTGCAATCCATAACTATTTAAAT | | |
| 24 | N277S | CTTGCTGCAATCGAAAGYTATTTAAATAAAACA | | |
| 25 | R310A | GGCTATTTGATATGGCAAATATTTTAAATGGT | | |
| 26 | E360Q | TCTGACAAGGCAGCAAGGTTA | | |
| 27 | Q391E | GATCCACTTCTGGAAGCAGTCAAACG | | |
| 28 | W439R | GGGGTAATAAAAGAATGTATGTCGGG | | |
| 29 | K444R | ATGTATGTCGGGCGACATAAAGCTGG | | |
| 30 | N471D | GATGGTTGGGGGATTTCACTGTAA | | |
| 31 | G476D | TTCACTGTAACGATGGGGCAGTTTCG | | |
| 32 | K484Q | GGTTTGGGTGCAGCAATAAAT | | |
| 33 | P18X | TTTGAATGGCATTGTGNNNAATGACGGGAACCAC | 部位特異的変異 (ΔRG/M2027用) | |
| 34 | A186X | AAATTCACCGAAAGNNNTGGGACTGGGAAGTA | | |
| 35 | Y243X | GTGAAACATATTAANNAGCTATACGAGAGAT | | |
| 36 | N277X | CTTGCTGCAATCGAANNNTATTTAAATAAAACA | | |
| 37 | N471E | GATGGTTGGGGGAATTTCACTGTAA | | |
| 38 | D128V | CCAACGAATCGTTGGCAGTAATTTCCAGGTGCCTACACG | 部位特異的変異 (K38AMY用) | |
| 39 | G140S | ATTGATGCGTGGACGAGTTTCCGACTTTTCAGGG | | |
| 40 | S144P | TTTCGACTTTCCAGGGCGTAA | | |
| 41 | R168Q | GGTGTGACTGGGATCAGCAATATCAAGAAAATCATATTTCC | | |
| 42 | N181V | CATATTTCCGCTTTGCAAAATACGGTNTGGAACAGGCGAGTG | | |
| 43 | E207D | AATATCGACTTAGTCATCCAGATGTACAAGATGAGTTGAAGGA | | |
| 44 | F272S | GACGTAGGTGCTCTCGAATCTTATTTAGATGAAATGAATTGGG | | |
| 45 | S375P | CGATAACATTCCAGCTAAAAA | | |
| 46 | W434R | GACCTGGTGGTTCCAAGAGAATGTATGTAGGACGTCAG | | |
| 47 | E466D | AATGGCGATGGATGGGGCATTCTTTACGAATGGAGGATCT | | |
| 48 | D128X | CCAACGAATCGTTGGCAGNNATTTCCAGGTGCCTACACG | | |
| 49 | QEYK | GTTGACTGGGATGAGCGAAACAAGAAAATCAT | | |
| 50 | N190F | TGGATGAAGAGTTCGGTAATTATGA | | |
| 51 | Q209V | AGTCATCCAGAGGTCGTAGATGAGTTGAAGGAT | | |

塩基配列中のNは、A、T、G及びCの混合塩基を、塩基配列中のYは、T及びCの混合塩基を表す。

【0041】

また、変異導入した遺伝子は、上記と同様にして、発現プロモーター領域と変異 - アミラーゼ遺伝子部分を再度 pKF19k の SmaI 部位に挿入することにより、異なる変異を導入する際の鑄型プラスミドとなり、上記と同様の方法によって更に別の変異を導入し

10

20

30

40

50

た。

得られた各変異組換えプラスミドを鋳型とし、プライマーCLUBG（配列番号9）及びLADH（配列番号6）、或いはプライマーCLUBG（配列番号9）及びK38DH（配列番号8）を用いてPCR反応を行うことによって、各変異遺伝子断片を増幅させ、これをSalIによって切断した後、発現ベクターpHSP64のSalI-SmaI部位に挿入して、各種の変異 - アミラーゼ生産用プラスミドを構築した（図1）。

【0042】

実施例3 変異 - アミラーゼの生産

実施例2で得られた各種変異 - アミラーゼ生産用プラスミドをプロトプラスト法（Mol. Gen. Genet., 168, 111, 1979）により枯草菌ISW1214株（*leuA metB5 hsdM1*）に導入し、得られた組換え枯草菌を液体培地（コーンステープリカー、4%；トリプトース、1%；肉エキス、1%；リン酸1カリウム、0.1%；硫酸マグネシウム、0.01%；マルトース、2%；塩化カルシウム、0.1%；テトラサイクリン、15 μg/mL）で30℃で4日間培養した。各種変異 - アミラーゼの活性は、培養上清液を用いて測定した。

10

【0043】

実施例4 アミラーゼ生産性の評価 - 1

実施例1、2及び3に記載の方法により、RGにおける18番目のProをSerに置換した酵素（P18S / RGと略する）、86番目のGlnをGluに置換した酵素（Q86E / RGと略する）、130番目のGluをValに置換した酵素（E130V / RGと略する）、154番目のAsnをAspに置換した酵素（N154D / RGと略する）、171番目のArgをCysに置換した酵素（R171C / RGと略する）、186番目のAlaをValに置換した酵素（A186V / RGと略する）、212番目のGluをAspに置換した酵素（E212D / RGと略する）、222番目のValをGluに置換した酵素（V222E / RGと略する）、243番目のTyrをCysに置換した酵素（Y243C / RGと略する）、260番目のProをGluに置換した酵素（P260E / RGと略する）、269番目のLysをGlnに置換した酵素（K269E / RGと略する）、276番目のGluをHisに置換した酵素（E276H / RGと略する）、277番目のAsnをSerに置換した酵素（N277S / RGと略する）、310番目のArgをAlaに置換した酵素（R310A / RGと略する）、360番目のGluをGlnに置換した酵素（E360Q / RGと略する）、391番目のGlnをGluに置換した酵素（Q391E / RGと略する）、439番目のTrpをArgに置換した酵素（W439R / RGと略する）、444番目のLysをArgに置換した酵素（K444R / RGと略する）、471番目のAsnをAspに置換した酵素（N471D / RGと略する）、及び476番目のGlyをAspに置換した酵素（G476D / RGと略する）それぞれのアミラーゼ生産性を検定した。対照としてRGを用いた。RGのアミラーゼ生産性を100%としてアミラーゼ生産性相対値（%）を求めた。結果を表3に示す。

20

30

【0044】

【表3】

40

| 酵素名 | アミラーゼ生産性相対値(%) |
|-----------|----------------|
| ΔRG | 100 |
| P18S/ΔRG | 277 |
| Q86E/ΔRG | 119 |
| E130V/ΔRG | 362 |
| N154D/ΔRG | 146 |
| R171C/ΔRG | 235 |
| A186V/ΔRG | 485 |
| E212D/ΔRG | 327 |
| V222E/ΔRG | 135 |
| Y243C/ΔRG | 350 |
| P260E/ΔRG | 142 |
| K269Q/ΔRG | 142 |
| E276H/ΔRG | 231 |
| N277S/ΔRG | 312 |
| R310A/ΔRG | 208 |
| E360Q/ΔRG | 162 |
| Q391E/ΔRG | 127 |
| W439R/ΔRG | 312 |
| K444R/ΔRG | 112 |
| N471D/ΔRG | 292 |
| G476D/ΔRG | 296 |

10

20

30

【0045】

いずれの変異酵素も RG に比べて高いアミラーゼ生産性を示し、変異によって組換え枯草菌に於ける - アミラーゼの高生産化が明らかになった。特に、E130V/RG、A186V/RG、E212D/RG、Y243C/RG、N277S/RG 及び W439R/RG では、RG の3倍以上の高生産性が認められ、A186V/RG においては RG の5倍近い飛躍的な高生産化が認められた。

【0046】

実施例5 アミラーゼ生産性の評価 - 2

実施例1、2及び3に記載の方法により、RG/MTにおける18番目のProをThrに置換した酵素(P18T/RG/MTと略する)、86番目のGlnをGluに置換した酵素(Q86E/RG/MTと略する)、130番目のGluをValに置換した酵素(E130V/RG/MTと略する)、186番目のAlaをAsnに置換した酵素(A186N/RG/MTと略する)、243番目のTyrをSerに置換した酵素(Y243S/RG/MTと略する)、277番目のAsnをPheに置換した酵素(N277F/RG/MTと略する)、及び471番目のAsnをGluに置換した酵素(N471E/RG/MTと略する)それぞれのアミラーゼ生産性を検定した。対照としてRG/MTを用いた。結果を表4に示す。

40

【0047】

【表4】

| 酵素名 | アミラーゼ生産性相対値(%) |
|--------------|----------------|
| ΔRG/MT | 100 |
| P18T/ΔRG/MT | 200 |
| Q86E/ΔRG/MT | 144 |
| E130V/ΔRG/MT | 344 |
| A186N/ΔRG/MT | 344 |
| Y243S/ΔRG/MT | 189 |
| N277F/ΔRG/MT | 256 |
| N471E/ΔRG/MT | 211 |

10

【0048】

いずれの変異酵素も RG/MT に比べて高いアミラーゼ生産性を示し、特に、E130V/RG/MT 及び A186N/RG/MT では、RG/MT の3倍以上の高生産性が認められた。

【0049】

実施例6 アミラーゼ生産性の評価 - 3

実施例1、2及び3に記載の方法により、K38AMYにおける128番目のAspをValに置換した酵素(D128Vと略する)、140番目のGlyをSerに置換した酵素(G140Sと略する)、144番目のSerをProに置換した酵素(S144Pと略する)、168番目のArgをGlnに置換した酵素(R168Qと略する)、181番目のAsnをValに置換した酵素(N181Vと略する)、207番目のGluをAspに置換した酵素(E207Dと略する)、272番目のPheをSerに置換した酵素(F272Sと略する)、375番目のSerをProに置換した酵素(S375Pと略する)、434番目のTrpをArgに置換した酵素(W434Rと略する)、及び466番目のGluをAspに置換した酵素(E466Dと略する)それぞれのアミラーゼ生産性を検定した。対照としてK38AMYを用いた。結果を表5に示す。

20

【0050】

【表5】

30

| 酵素名 | アミラーゼ生産性相対値(%) |
|--------|----------------|
| K38AMY | 100 |
| D128V | 325 |
| G140S | 209 |
| S144P | 197 |
| R168Q | 264 |
| N181V | 207 |
| E207D | 109 |
| F272S | 175 |
| S375P | 115 |
| W434R | 124 |
| E466D | 212 |

40

【0051】

いずれの変異酵素も野生型K38AMYに比べて高いアミラーゼ生産性を示し、特にD1

50

28Vでは3倍以上の高生産性が認められた。

【0052】

実施例7 アミラーゼ生産性の評価 - 4

実施例6に示した変異のうち、S144P及びN181Vを組み合わせた変異酵素 S144P/N181V (SPNVと略する)のアミラーゼ生産性を、実施例3に記載の方法により検定した。対照として、K38AMY、S144P及びN181Vを用いた。結果を表6に示す。

【0053】

【表6】

| 酵素名 | アミラーゼ生産性相対値(%) |
|--------|----------------|
| K38AMY | 100 |
| S144P | 197 |
| N181V | 207 |
| SPNV | 257 |

10

【0054】

この結果、表5に示した様に、組み合わせによるアミラーゼ生産性の更なる向上が認められた。

20

【0055】

実施例8 アミラーゼ生産性の評価 - 5

実施例1、2及び3に記載の方法により、耐熱性改良酵素 LA-K38AMY/NFQVの遺伝子における168番目のArgをGlnに置換した酵素(R168Q/LA-K38AMY/NFQVと略する)、466番目のGluをAspに置換した酵素(E466D/LA-K38AMY/NFQVと略する)、及び実施例6に示した二重変異を導入した酵素(SPNV/LA-K38AMY/NFQVと略する)それぞれのアミラーゼ生産性を検定した。対照として、LA-K38AMY/NFQVを用いた。結果を表7に示す。

30

【0056】

【表7】

| 酵素名 | アミラーゼ生産性相対値(%) |
|----------------------|----------------|
| LA-K38AMY/NFQV | 100 |
| R168Q/LA-K38AMY/NFQV | 304 |
| E466D/LA-K38AMY/NFQV | 264 |
| SPNV/LA-K38AMY/NFQV | 154 |

40

【0057】

この結果、いずれの変異酵素もLA-K38AMY/NFQVに比べて約1.5倍以上の高いアミラーゼ生産性を示し、特にR168Q/LA-K38AMY/NFQVでは約3倍の高生産性が認められた。

【0058】

実施例9 アミラーゼ生産性の評価 - 6

実施例1、2及び3に記載の方法により、耐熱性改良酵素 LA-K38AMY/QEYK/NFQVの遺伝子における128番目のAspをValに置換する変異(D128V/LA-K38AMY/QEYK/NFQVと略する)、及び実施例6に示した二重変異

50

を導入した酵素（SPNV/LA-K38AMY/QEYK/NFQVと略する）それぞれのアミラーゼ生産性を検定した。対照として、LA-K38AMY/QEYK/NFQVを用いた。結果を表8に示す。

【0059】

【表8】

| 酵素名 | アミラーゼ生産性相対値(%) |
|---------------------------|----------------|
| LA-K38AMY/QEYK/NFQV | 100 |
| D128V/LA-K38AMY/QEYK/NFQV | 602 |
| SPNV/LA-K38AMY/QEYK/NFQV | 427 |

10

【0060】

この結果、いずれの変異酵素もLA-K38AMY/QEYK/NFQVに比べて非常に高いアミラーゼ生産性を示し、特にD128V/LA-K38AMY/QEYK/NFQVでは約6倍の飛躍的な高生産化が認められた。

【0061】

実施例10 アミラーゼ生産性の評価 - 7

実施例8に示した変異のうち、飛躍的な高生産化が認められたD128V/LA-K38AMY/QEYK/NFQVに、酸化剤耐性をより強化する変異、即ち107番目のMetをLeuに置換する変異（M107Lと略する）を実施例1及び2に記載の方法により導入した（ML/DV/LA-K38AMY/QEYK/NFQVと略する）。

20

【0062】

次に、変異酵素ML/DV/LA-K38AMY/QEYK/NFQVの遺伝子を用いて実施例4の方法によりアミラーゼ生産性を検定した。対照として、D128V/LA-K38AMY/QEYK/NFQVを用いた。結果を表9に示す。

【0063】

【表9】

| 酵素名 | アミラーゼ生産性相対値(%) |
|---------------------------------|----------------|
| D128V/LA-K38AMY/QEYK/NFQV | 100 |
| M107L/D128V/LA-K38AMY/QEYK/NFQV | 115 |

30

【0064】

変異酵素ML/DV/LA-K38AMY/QEYK/NFQVのアミラーゼ生産性相対値は115%となり、酸化剤耐性をより強化するM107L変異を導入しても、組換え枯草菌に於けるアミラーゼの高生産性には影響を与えないことが明らかとなった。

【0065】

実施例11 アミラーゼ生産性の評価 - 8

40

実施例1、2及び3に記載の方法により、耐熱性改良酵素QEYK/NFQVの遺伝子における128番目のAspをGlnに置換した酵素（D128Q/QEYK/NFQVと略する）のアミラーゼ生産性を検定した。対照として、QEYK/NFQVを用いた。結果を表10に示す。

【0066】

【表10】

| 酵素名 | アミラーゼ生産性相対値(%) |
|-----------------|----------------|
| QEYK/NFQV | 100 |
| D128Q/QEYK/NFQV | 247 |

【0067】

変異酵素はQEYK/NFQVに比べて2倍以上の高生産性が認められた。

【0068】

実施例12 溶解性の検定

表11に示す各変異酵素標品を4℃で1週間保存した後、遠心分離(13000rpm、10分、4℃)によって生じた沈殿を分離した。沈殿は遠心分離前と同容量の2mM CaCl₂を含むTris-HCl緩衝液(pH7.0)に懸濁させた後、同緩衝液液で約500倍に希釈することによって溶解させ、酵素活性を測定した。また、上清液も同様に希釈して酵素活性を測定した。求められた沈殿及び上清液の活性値を、4℃保存前の標品の酵素活性を比較することによって各変異酵素の溶解性を評価した。結果を表11に併せて示す。

【0069】

【表11】

| 酵素 | 4℃保存後の残存活性(%) | |
|----------------|---------------|----|
| | 上清液 | 沈殿 |
| ΔRG | 55 | 40 |
| ΔRG Gln86→Glu | 83 | 11 |
| ΔRG Pro260→Glu | 70 | 18 |
| ΔRG Lys269→Gln | 74 | 27 |
| ΔRG Asn471→Asp | 74 | 23 |
| ΔRG Lys484→Gln | 71 | 24 |

【0070】

この結果、181番目のArgと182番目のGlyを欠失させることによって耐熱性が向上した改良アミラーゼ(ΔRG)は、4℃で1週間保存することによって、酵素の沈殿が認められ、上清液中には活性の約半分が残存したのみであることに対して、ΔRG-LAMYに更なる変異を導入した各変異酵素では、上清液への活性残存率が高く、変異によって溶解率が向上したことが明らかになった。特に、86番目のGlnをGluに置換した酵素の溶解率は最も高く、本条件で上清液に8割の酵素が残存した。

実施例13 自動食器洗浄機用洗浄剤組成物

表12に示す配合で自動食器洗浄機用洗浄剤組成物を製造し、本洗浄剤に高生産化方法により得られた各種の変異酵素を配合して洗浄試験を行った。この結果、同一活性値の酵素を添加した場合、高生産化変異酵素は対照酵素と比較して同等あるいは優れた洗浄効果を示した。

【0071】

【表12】

10

20

30

40

| 洗剤組成 | (%) |
|-------------------------|------|
| プルロニックL-61 | 2.2 |
| 炭酸ナトリウム | 24.7 |
| 炭酸水素ナトリウム | 24.7 |
| 過炭酸ナトリウム | 10.0 |
| 1号珪酸ナトリウム | 12.0 |
| クエン酸3ナトリウム | 20.0 |
| ポリプロピレングリコール | 2.2 |
| シリコーンKST-04 (東芝シリコーン社製) | 0.2 |
| ソカランCP-45 (BASF社製) | 4.0 |

10

【0072】

【発明の効果】

本発明の変異 -アミラーゼを用いれば、組換え微生物より高収率で -アミラーゼを得ることができ、工業生産に於ける大幅なコストダウンが可能である。また、本発明における高生産化のための変異は、酵素の生化学的性質は影響を与えないことから、耐熱性、キレート剤耐性及び酸化剤耐性を有し、洗浄剤用酵素として有益なアルカリ液化型 -アミラーゼの高生産化を図ることができる。

20

【0073】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KAO CORPORATION

<120> Highly productive alpha-amylases

<130> P04831210

10

<160> 51

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 485

20

<212> PRT

<213> Bacillus sp. KSM-AP1378

<400> 1

His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp His

5

10

15

Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Asp Asp Ala Ala

30

20

25

30

Asn Leu Lys Ser Lys Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp

35

40

45

Lys Gly Thr Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr

50

55

60

Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly

65

70

75

80

40

Thr Arg Ser Gln Leu Gln Gly Ala Val Thr Ser Leu Lys Asn Asn Gly

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 85 | | 90 | | 95 | | | | | | | | | | |
| Ile | Gln | Val | Tyr | Gly | Asp | Val | Val | Met | Asn | His | Lys | Gly | Gly | Ala | Asp |
| | 100 | | | | | | | 105 | | | | | | 110 | |
| Gly | Thr | Glu | Met | Val | Asn | Ala | Val | Glu | Val | Asn | Arg | Ser | Asn | Arg | Asn |
| | 115 | | | | | | | 120 | | | | | | 125 | |
| Gln | Glu | Ile | Ser | Gly | Glu | Tyr | Thr | Ile | Glu | Ala | Trp | Thr | Lys | Phe | Asp |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | |
| Phe | Pro | Gly | Arg | Gly | Asn | Thr | His | Ser | Asn | Phe | Lys | Trp | Arg | Trp | Tyr |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 |
| His | Phe | Asp | Gly | Thr | Asp | Trp | Asp | Gln | Ser | Arg | Gln | Leu | Gln | Asn | Lys |
| | | | 165 | | | | | 170 | | | | | | 175 | |
| Ile | Tyr | Lys | Phe | Arg | Gly | Thr | Gly | Lys | Ala | Trp | Asp | Trp | Glu | Val | Asp |
| | 180 | | | | | | | 185 | | | | | | 190 | |
| Ile | Glu | Asn | Gly | Asn | Tyr | Asp | Tyr | Leu | Met | Tyr | Ala | Asp | Ile | Asp | Met |
| | 195 | | | | | | 200 | | | | | 205 | | | |
| Asp | His | Pro | Glu | Val | Ile | Asn | Glu | Leu | Arg | Asn | Trp | Gly | Val | Trp | Tyr |
| | 210 | | | | | | 215 | | | | | 220 | | | |
| Thr | Asn | Thr | Leu | Asn | Leu | Asp | Gly | Phe | Arg | Ile | Asp | Ala | Val | Lys | His |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 |
| Ile | Lys | Tyr | Ser | Tyr | Thr | Arg | Asp | Trp | Leu | Thr | His | Val | Arg | Asn | Thr |
| | | | | 245 | | | | | | 250 | | | | 255 | |
| Thr | Gly | Lys | Pro | Met | Phe | Ala | Val | Ala | Glu | Phe | Trp | Lys | Asn | Asp | Leu |
| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | | 270 | |
| Ala | Ala | Ile | Glu | Asn | Tyr | Leu | Asn | Lys | Thr | Ser | Trp | Asn | His | Ser | Val |
| | | 275 | | | | | | 280 | | | | | 285 | | |
| Phe | Asp | Val | Pro | Leu | His | Tyr | Asn | Leu | Tyr | Asn | Ala | Ser | Asn | Ser | Gly |
| | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | |
| Gly | Tyr | Phe | Asp | Met | Arg | Asn | Ile | Leu | Asn | Gly | Ser | Val | Val | Gln | Lys |
| 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 |

10

20

30

40

His Pro Ile His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro
 325 330 335
 Gly Glu Ala Leu Glu Ser Phe Val Gln Ser Trp Phe Lys Pro Leu Ala
 340 345 350
 Tyr Ala Leu Ile Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr
 355 360 365
 Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ser Met Lys Ser 10
 370 375 380
 Lys Ile Asp Pro Leu Leu Gln Ala Arg Gln Thr Tyr Ala Tyr Gly Thr
 385 390 395 400
 Gln His Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu
 405 410 415
 Gly Asp Ser Ser His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp
 420 425 430 20
 Gly Pro Gly Gly Asn Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys His Lys Ala Gly
 435 440 445
 Gln Val Trp Arg Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Gly Thr Val Thr Ile
 450 455 460
 Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Thr Val Asn Gly Gly Ala Val Ser
 465 470 475 480
 Val Trp Val Lys Gln 30
 485

[0 0 7 4]

(210) 2
 (211) 480
 (212) PRT
 (213) *Bacillus* sp. KSM-K38

(400) 2

| | |
|--|----|
| Asp Gly Leu Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Tyr Glu Trp His Leu Glu | 10 |
| 5 10 15 | |
| Asn Asp Gly Gln His Trp Asn Arg Leu His Asp Asp Ala Ala Ala Leu | |
| 20 25 30 | |
| Ser Asp Ala Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly | |
| 35 40 45 | |
| Asn Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu | 20 |
| 50 55 60 | |
| Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys | |
| 65 70 75 80 | |
| Ala Gln Leu Glu Arg Ala Ile Gly Ser Leu Lys Ser Asn Asp Ile Asn | |
| 85 90 95 | |
| Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Met Gly Ala Asp Phe Thr | |
| 100 105 110 | |
| Glu Ala Val Gln Ala Val Gln Val Asn Pro Thr Asn Arg Trp Gln Asp | 30 |
| 115 120 125 | |
| Ile Ser Gly Ala Tyr Thr Ile Asp Ala Trp Thr Gly Phe Asp Phe Ser | |
| 130 135 140 | |
| Gly Arg Asn Asn Ala Tyr Ser Asp Phe Lys Trp Arg Trp Phe His Phe | |
| 145 150 155 160 | |
| Asn Gly Val Asp Trp Asp Gln Arg Tyr Gln Glu Asn His Ile Phe Arg | 40 |
| 165 170 175 | |
| Phe Ala Asn Thr Asn Trp Asn Trp Arg Val Asp Glu Glu Asn Gly Asn | |

| | | | | | | |
|---|---|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 180 | | 185 | | 190 | |
| Tyr Asp Tyr | Leu Leu Gly Ser Asn Ile Asp Phe Ser His Pro Glu Val | | | | | |
| | 195 | | 200 | | 205 | |
| Gln Asp Glu | Leu Lys Asp Trp Gly Ser Trp Phe Thr Asp Glu Leu Asp | | | | | |
| | 210 | | 215 | | 220 | |
| Leu Asp Gly Tyr Arg Leu Asp Ala Ile Lys His Ile Pro Phe Trp Tyr | | | | | | |
| 225 | | 230 | | 235 | | 240 |
| Thr Ser Asp Trp Val Arg His Gln Arg Asn Glu Ala Asp Gln Asp Leu | | | | | | |
| | 245 | | 250 | | 255 | |
| Phe Val Val Gly Glu Tyr Trp Lys Asp Asp Val Gly Ala Leu Glu Phe | | | | | | |
| | 260 | | 265 | | 270 | |
| Tyr Leu Asp Glu Met Asn Trp Glu Met Ser Leu Phe Asp Val Pro Leu | | | | | | |
| | 275 | | 280 | | 285 | |
| Asn Tyr Asn Phe Tyr Arg Ala Ser Gln Gln Gly Gly Ser Tyr Asp Met | | | | | | |
| | 290 | | 295 | | 300 | |
| Arg Asn Ile Leu Arg Gly Ser Leu Val Glu Ala His Pro Met His Ala | | | | | | |
| 305 | | 310 | | 315 | | 320 |
| Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Glu Ser Leu Glu | | | | | | |
| | 325 | | 330 | | 335 | |
| Ser Trp Val Ala Asp Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Thr Ile Leu | | | | | | |
| | 340 | | 345 | | 350 | |
| Thr Arg Glu Gly Gly Tyr Pro Asn Val Phe Tyr Gly Asp Tyr Tyr Gly | | | | | | |
| | 355 | | 360 | | 365 | |
| Ile Pro Asn Asp Asn Ile Ser Ala Lys Lys Asp Met Ile Asp Glu Leu | | | | | | |
| | 370 | | 375 | | 380 | |
| Leu Asp Ala Arg Gln Asn Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His Asp Tyr Phe | | | | | | |
| 385 | | 390 | | 395 | | 400 |
| Asp His Trp Asp Val Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Ser Ser Ser Arg | | | | | | |
| | 405 | | 410 | | 415 | |

10

20

30

40

Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asn Gly Pro Gly Gly Ser
 420 425 430
 Lys Trp Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Gln Thr Trp Thr Asp
 435 440 445
 Leu Thr Gly Asn Asn Gly Ala Ser Val Thr Ile Asn Gly Asp Gly Trp
 450 455 460
 Gly Glu Phe Phe Thr Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Tyr Val Asn Gln
 465 470 475 480

[0 0 7 5]

<210> 3
 <211> 1786
 <212> DNA
 <213> Bacillus sp. KSM-AP1378

<220>
 <221> sig#peptide 10
 <222> (155)..(247)

<220>
 <221> mat#peptide
 <222> (248)..(1702)

<220> 20
 <221> CDS
 <222> (155)..(1702)

<400> 3
 cagcgtgata atataaattt gaaatgaaca cctatgaaaa tatggtagcg attgcgcgac 60
 gagaaaaaac ttgggagtta ggaagtigata ttaaaggatt ttttttgact tgttgtgaaa 120
 acgcttgcatt aaattgaagg agaggggtgct tttt atg aaa ctt cat aac cgt ata 175 30
 att agc gta cta tta aca cta ttg tta gct gta gct gtt ttg ttt cca 223
 tat atg acg gaa cca gca caa gcc cat cat aat ggg acg aat ggg acc 271
 His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr
 1 5
 atg atg cag tat ttt gaa tgg cat ttg cca aat gac ggg aac cac tgg 319
 Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp His Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp
 10 15 20 40
 aac agg tta cga gat gac gca gct aac tta aag agt aaa ggg att acc 367

| | | |
|---|-----|-----|
| Asn Arg Leu Arg Asp Asp Ala Ala Asn Leu Lys Ser Lys Gly Ile Thr | | |
| 25 | 30 | 40 |
| gct gtt tgg att cct cct gca tgg aag ggg act tcg caa aat gat gtt | 415 | |
| Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp Lys Gly Thr Ser Gln Asn Asp Val | | |
| 45 | 50 | 55 |
| ggg tat ggt gcc tat gat ttg tac gat ctt ggt gag ttt aac caa aag | 463 | |
| Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys | | 10 |
| 60 | 65 | 70 |
| gga acc gtc cgt aca aaa tat ggc aca agg agt cag ttg caa ggt gcc | 511 | |
| Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Arg Ser Gln Leu Gln Gly Ala | | |
| 75 | 80 | 85 |
| gtg aca tct ttg aaa aat aac ggg att caa gtt tat ggg gat gtc gtg | 559 | |
| Val Thr Ser Leu Lys Asn Asn Gly Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val | | 20 |
| 90 | 95 | 100 |
| atg aat cat aaa ggt gga gca gac ggg aca gag atg gta aat gcg gtg | 607 | |
| Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp Gly Thr Glu Met Val Asn Ala Val | | |
| 105 | 110 | 115 |
| gaa gtg aac cga agc aac cga aac caa gaa ata tca ggt gaa tac acc | 655 | |
| Glu Val Asn Arg Ser Asn Arg Asn Gln Glu Ile Ser Gly Glu Tyr Thr | | |
| 125 | 130 | 135 |
| att gaa gca tgg acg aaa ttt gat ttc cct gga aga gga aat acc cat | 703 | |
| Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr His | | 30 |
| 140 | 145 | 150 |
| tcc aac ttt aaa tgg cgc tgg tat cat ttt gat ggg aca gat tgg gat | 751 | |
| Ser Asn Phe Lys Trp Arg Trp Tyr His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp | | |
| 155 | 160 | 165 |
| cag tca cgt cag ctt cag aac aaa ata tat aaa ttc aga ggt acc gga | 799 | |
| Gln Ser Arg Gln Leu Gln Asn Lys Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Thr Gly | | 40 |
| 170 | 175 | 180 |

| | | |
|---|------|-----|
| aag gca tgg gac tgg gaa gta gat ata gag aac ggc aac tat gat tac | 847 | |
| Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Ile Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr | | |
| 185 | 190 | 195 |
| 200 | | |
| ctt atg tat gca gac att gat atg gat cat cca gaa gta atc aat gaa | 895 | |
| Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Met Asp His Pro Glu Val Ile Asn Glu | | |
| 205 | 210 | 215 |
| ctt aga aat tgg gga gtt tgg tat aca aat aca ctt aat cta gat gga | 943 | 10 |
| Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr Thr Asn Thr Leu Asn Leu Asp Gly | | |
| 220 | 225 | 230 |
| ttt aga atc gat gct gtg aaa cat att aaa tac agc tat acg aga gat | 991 | |
| Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His Ile Lys Tyr Ser Tyr Thr Arg Asp | | |
| 235 | 240 | 245 |
| tgg cta aca cat gtg cgt aac acc aca ggt aaa cca atg ttt gca gtt | 1039 | |
| Trp Leu Thr His Val Arg Asn Thr Thr Gly Lys Pro Met Phe Ala Val | | 20 |
| 250 | 255 | 260 |
| gca gaa ttt tgg aaa aat gac ctt gct gca atc gaa aac tat tta aat | 1087 | |
| Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu Ala Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Asn | | |
| 265 | 270 | 275 |
| 280 | | |
| aaa aca agt tgg aat cac tcc gtg ttc gat gtt cct ctt cat tat aat | 1135 | |
| Lys Thr Ser Trp Asn His Ser Val Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn | | |
| 285 | 290 | 295 |
| ttg tac aat gca tct aat agt ggt ggc tat ttt gat atg aga aat att | 1183 | |
| Leu Tyr Asn Ala Ser Asn Ser Gly Gly Tyr Phe Asp Met Arg Asn Ile | | |
| 300 | 305 | 310 |
| tta aat ggt tct gtc gta caa aaa cac cct ata cat gca gtc aca ttt | 1231 | |
| Leu Asn Gly Ser Val Val Gln Lys His Pro Ile His Ala Val Thr Phe | | |
| 315 | 320 | 325 |
| gtt gat aac cat gac tct cag cca gga gaa gca ttg gaa tcc ttt gtt | 1279 | |
| Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro Gly Glu Ala Leu Glu Ser Phe Val | | 40 |

| | | | | |
|--|-----|-----|------|-----|
| 330 | 335 | 340 | | |
| caa tcg tgg ttc aaa cca ctg gca tat gca ttg att ctg aca agg gag | | | 1327 | |
| Gln Ser Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Leu Ile Leu Thr Arg Glu | | | | |
| 345 | 350 | 355 | 360 | |
| caa ggt tac cct tcc gta ttt tac ggt gat tac tac ggt ata cca act | | | 1375 | |
| Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr | | | | |
| | 365 | 370 | 375 | 10 |
| cat ggt gtt cct tcg atg aaa tct aaa att gat cca ctt ctg cag gca | | | 1423 | |
| His Gly Val Pro Ser Met Lys Ser Lys Ile Asp Pro Leu Leu Gln Ala | | | | |
| | 380 | 385 | 390 | |
| cgt caa acg tat gcc tac gga acc caa cat gat tat ttt gat cat cat | | | 1471 | |
| Arg Gln Thr Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His Asp Tyr Phe Asp His His | | | | |
| | 395 | 400 | 405 | |
| gat att atc ggc tgg acg aga gaa ggg gac agc tcc cac cca aat tca | | | 1519 | 20 |
| Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp Ser Ser His Pro Asn Ser | | | | |
| | 410 | 415 | 420 | |
| gga ctt gca act att atg tcc gat ggg cca ggg ggt aat aaa tgg atg | | | 1567 | |
| Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp Gly Pro Gly Gly Asn Lys Trp Met | | | | |
| | 425 | 430 | 435 | 440 |
| tat gtc ggg aaa cat aaa gct ggc caa gta tgg aga gat atc acc gga | | | 1615 | |
| Tyr Val Gly Lys His Lys Ala Gly Gln Val Trp Arg Asp Ile Thr Gly | | | | 30 |
| | 445 | 450 | 455 | |
| aat agg tct ggt acc gtc acc att aat gca gat ggt tgg ggg aat ttc | | | 1663 | |
| Asn Arg Ser Gly Thr Val Thr Ile Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe | | | | |
| | 460 | 465 | 470 | |
| act gta aac gga ggg gca gtt tcg gtt tgg gtg aag caa taaataagga | | | 1712 | |
| Thr Val Asn Gly Gly Ala Val Ser Val Trp Val Lys Gln | | | | |
| | 475 | 480 | 485 | 40 |
| acaagaggcg aaaattactt tccatcatgc agagctttcc gatcactcat acaccaata | | | 1772 | |
| taaattggaa gctt | | | 1786 | |

[0 0 7 6]

<210> 4
 <211> 1753
 <212> DNA
 <213> Bacillus sp. KSM-K38

<220>
 <221> sig#peptide 10
 <222> (162)..(224)

<220>
 <221> mat#peptide
 <222> (225)..(1664)

<220> 20
 <221> CDS
 <222> (162)..(1664)

<400> 4
 gtatgcgaaa cgaigcgcaa aactgcgcaa ctactagcac tcttcagga ctaccacc 60
 tttttccaa aaatgacatc atataaaciaa atttgtctac caatcactat ttaaagctgt 120
 ttatgatata tgtaagcgtt atcattaaaa ggaggtattt g atg aga aga tgg gta 176 30
 gta gca atg ttg gca gtg tta ttt tta ttt cct tcg gta gta gtt gca 224
 gat gga ttg aac ggt acg atg atg cag tat tat gag tgg cat ttg gaa 272
 Asp Gly Leu Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Tyr Glu Trp His Leu Glu
 1 5 10 15
 aac gac ggg cag cat tgg aat cgg ttg cac gat gat gcc gca gct ttg 320
 Asn Asp Gly Gln His Trp Asn Arg Leu His Asp Asp Ala Ala Ala Leu 40
 20 25 30
 agt gat gct ggt att aca gct att tgg att ccg cca gcc tac aaa ggt 368

| | | |
|---|-----|-----|
| Ser Asp Ala Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly | | |
| 35 | 40 | 45 |
| aat agt cag gcg gat gtt ggg tac ggt gca tac gat ctt tat gat tta | 416 | |
| Asn Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu | | |
| 50 | 55 | 60 |
| gga gag ttc aat caa aag ggt act gtt cga acg aaa tac gga act aag | 464 | |
| Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys | | 10 |
| 65 | 70 | 80 |
| gca cag ctt gaa cga gct att ggg tcc ctt aaa tct aat gat atc aat | 512 | |
| Ala Gln Leu Glu Arg Ala Ile Gly Ser Leu Lys Ser Asn Asp Ile Asn | | |
| 85 | 90 | 95 |
| gta tac gga gat gtc gtg atg aat cat aaa atg gga gct gat ttt acg | 560 | |
| Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Met Gly Ala Asp Phe Thr | | 20 |
| 100 | 105 | 110 |
| gag gca gtg caa gct gtt caa gta aat cca acg aat cgt tgg cag gat | 608 | |
| Glu Ala Val Gln Ala Val Gln Val Asn Pro Thr Asn Arg Trp Gln Asp | | |
| 115 | 120 | 125 |
| att tca ggt gcc tac acg att gat gcg tgg acg ggt ttc gac ttt tca | 656 | |
| Ile Ser Gly Ala Tyr Thr Ile Asp Ala Trp Thr Gly Phe Asp Phe Ser | | |
| 130 | 135 | 140 |
| ggg cgt aac aac gcc tat tca gat ttt aag tgg aga tgg ttc cat ttt | 704 | 30 |
| Gly Arg Asn Asn Ala Tyr Ser Asp Phe Lys Trp Arg Trp Phe His Phe | | |
| 145 | 150 | 160 |
| aat ggt gtt gac tgg gat cag cgc tat caa gaa aat cat att ttc cgc | 752 | |
| Asn Gly Val Asp Trp Asp Gln Arg Tyr Gln Glu Asn His Ile Phe Arg | | |
| 165 | 170 | 175 |
| ttt gca aat acg aac tgg aac tgg cga gtg gat gaa gag aac ggt aat | 800 | 40 |
| Phe Ala Asn Thr Asn Trp Asn Trp Arg Val Asp Glu Glu Asn Gly Asn | | |
| 180 | 185 | 190 |

| | | |
|---|------|-----|
| tat gat tac ctg tta gga tcg aat atc gac ttt agt cat cca gaa gta | 848 | |
| Tyr Asp Tyr Leu Leu Gly Ser Asn Ile Asp Phe Ser His Pro Glu Val | | |
| 195 | 200 | 205 |
| caa gat gag ttg aag gat tgg ggt agc tgg ttt acc gat gag tta gat | 896 | |
| Gln Asp Glu Leu Lys Asp Trp Gly Ser Trp Phe Thr Asp Glu Leu Asp | | |
| 210 | 215 | 220 |
| ttg gat ggt tat cgt tta gat gct att aaa cat att cca ttc tgg tat | 944 | 10 |
| Leu Asp Gly Tyr Arg Leu Asp Ala Ile Lys His Ile Pro Phe Trp Tyr | | |
| 225 | 230 | 235 |
| aca tct gat tgg gtt cgg cat cag cgc aac gaa gca gat caa gat tta | 992 | |
| Thr Ser Asp Trp Val Arg His Gln Arg Asn Glu Ala Asp Gln Asp Leu | | |
| 245 | 250 | 255 |
| ttt gtc gta ggg gaa tat tgg aag gat gac gta ggt gct ctc gaa ttt | 1040 | 20 |
| Phe Val Val Gly Glu Tyr Trp Lys Asp Asp Val Gly Ala Leu Glu Phe | | |
| 260 | 265 | 270 |
| tat tta gat gaa atg aat tgg gag atg tct cta ttc gat gtt cca ctt | 1088 | |
| Tyr Leu Asp Glu Met Asn Trp Glu Met Ser Leu Phe Asp Val Pro Leu | | |
| 275 | 280 | 285 |
| aat tat aat ttt tac cgg gct tca caa caa ggt gga agc tat gat atg | 1136 | |
| Asn Tyr Asn Phe Tyr Arg Ala Ser Gln Gln Gly Gly Ser Tyr Asp Met | | 30 |
| 290 | 295 | 300 |
| cgt aat att tta cga gga tct tta gta gaa gcg cat ccg atg cat gca | 1184 | |
| Arg Asn Ile Leu Arg Gly Ser Leu Val Glu Ala His Pro Met His Ala | | |
| 305 | 310 | 315 |
| gtt acg ttt gtt gat aat cat gat act cag cca ggg gag tca tta gag | 1232 | |
| Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Glu Ser Leu Glu | | |
| 325 | 330 | 335 |
| tca tgg gtt gct gat tgg ttt aag cca ctt gct tat gcg aca att ttg | 1280 | 40 |
| Ser Trp Val Ala Asp Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Thr Ile Leu | | |

| | | | |
|--|------|-----|-----|
| 340 | 345 | 350 | |
| acg cgt gaa ggt ggt tat cca aat gta ttt tac ggt gat tac tat ggg | 1328 | | |
| Thr Arg Glu Gly Gly Tyr Pro Asn Val Phe Tyr Gly Asp Tyr Tyr Gly | | | |
| 355 | 360 | 365 | |
| att cct aac gat aac att tca gct aaa aaa gat atg att gat gag ctg | 1376 | | |
| Ile Pro Asn Asp Asn Ile Ser Ala Lys Lys Asp Met Ile Asp Glu Leu | | | |
| 370 | 375 | 380 | 10 |
| ctt gat gca cgt caa aat tac gca tat ggc acg cag cat gac tat ttt | 1424 | | |
| Leu Asp Ala Arg Gln Asn Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His Asp Tyr Phe | | | |
| 385 | 390 | 395 | 400 |
| gat cat tgg gat gtt gta gga tgg act agg gaa gga tct tcc tcc aga | 1472 | | |
| Asp His Trp Asp Val Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Ser Ser Ser Arg | | | |
| 405 | 410 | 415 | |
| cct aat tca ggc ctt gcg act att atg tcg aat gga cct ggt ggt tcc | 1520 | | 20 |
| Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asn Gly Pro Gly Gly Ser | | | |
| 420 | 425 | 430 | |
| aag tgg atg tat gta gga cgt cag aat gca gga caa aca tgg aca gat | 1568 | | |
| Lys Trp Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Gln Thr Trp Thr Asp | | | |
| 435 | 440 | 445 | |
| tta act ggt aat aac gga gcg tcc gtt aca att aat ggc gat gga tgg | 1616 | | |
| Leu Thr Gly Asn Asn Gly Ala Ser Val Thr Ile Asn Gly Asp Gly Trp | | | 30 |
| 450 | 455 | 460 | |
| ggc gaa ttc ttt acg aat gga gga tct gta tcc gtg tac gtg aac caa | 1664 | | |
| Gly Glu Phe Phe Thr Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Tyr Val Asn Gln | | | |
| 465 | 470 | 475 | 480 |
| taacaaaag ccttgagaag ggattcctcc ctaactcaag gctttcttta tgtegcttag | 1724 | | |
| cittaacgctt ctacgacttt gaagcttta | 1753 | | |

[0 0 7 7]

<210>5

<211>30

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>5

gagtcgacca gcacaagccc atcataatgg 30

10

[0 0 7 8]

<210>6

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>6

20

taaagcttca atttatattg g 21

[0 0 7 9]

<210>7

<211>40

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

30

<400>7

gggtcgacca gcacaagccg atggattgaa cggctacgatg 40

[0 0 8 0]

<210>8

<211>29

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

40

<400>8

taaagctttt gttattggtt cacgtacac 29

[0 0 8 1]

<210>9

<211>27

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>9

ccagatctac ttaccatttt agagtca 27

10

[0 0 8 2]

<210>10

<211>34

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>10

20

atttgccaaa tgacgggcag cattggaatc ggtt 34

[0 0 8 3]

<210>11

<211>34

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

30

<400>11

aaccgattcc aatgctgccc gtcatttggc aaat 34

[0 0 8 4]

<210>12

<211>34

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

40

<400>12

tttgaatggc atttgcataa tgacggggaa ccac 34

[0 0 8 5]

<210>13

<211>33

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>13

acaaggagtc agttggaagg tgccgtgaca tct 33

10

[0 0 8 6]

<210>14

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>14

20

cgaaccaag taatcagg t 21

[0 0 8 7]

<210>15

<211>27

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

30

<400>15

aataccatt ccgattttaa atggcgc 27

[0 0 8 8]

<210>16

<211>33

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

40

<400>16

gattgggatac agtcatgyca gcttcagaac aaa 33

[0 0 8 9]

<210>17

<211>33

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>17

aaattcaccg gaaaggtatg ggactgggaa gta 33

10

[0 0 9 0]

<210>18

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>18

20

tcatccagat gtaatcaatg 20

[0 0 9 1]

<210>19

<211>33

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

30

<400>19

cttagaaatt ggggagaatg gtatacaaat aca 33

[0 0 9 2]

<210>20

<211>33

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

40

<400>20

gtgaaacata ttaaatgcag ctatagaga gat 33

[0 0 9 3]

<210>21

<211>33

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>21

aacaccacag gtaaagaaat gttgcagtt gca 33

10

[0 0 9 4]

<210>22

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>22

20

agaattttgg caaatgacc t 21

[0 0 9 5]

<210>23

<211>26

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

30

<400>23

tigctgcaat ccataactat ttaaat 26

[0 0 9 6]

<210>24

<211>33

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

40

<400>24

cttgctgcaa tcgaaagyta tttaaataaa aca 33

[0 0 9 7]

<210>25

<211>33

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>25

ggctattttg atatggcaaa tattttaaat ggt 33

10

[0 0 9 8]

<210>26

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>26

20

tctgacaagg cagcaaggtt a 21

[0 0 9 9]

<210>27

<211>27

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

30

<400>27

gatccattc tggaagcagc tcaaacg 27

[0 1 0 0]

<210>28

<211>27

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

40

<400>28

gggggtaata aaagaatgta tgcggg 27

[0 1 0 1]

<210>29

<211>26

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>29

atgtatgtcg ggcgacataa agctgg 26

10

[0 1 0 2]

<210>30

<211>25

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>30

20

gatggttggg gggatttcac tgtaa 25

[0 1 0 3]

<210>31

<211>27

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

30

<400>31

ttcactgtaa acgatggggc agtttcg 27

[0 1 0 4]

<210>32

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

40

<400>32

ggtttgggtg cagcaataaa t

[0 1 0 5]

<210>33

<211>33

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>33

tttgaatggc atttgnnnaa tgacgggaac cac 33

10

[0 1 0 6]

<210>34

<211>33

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>34

20

aaattcaccg gaaagnnntg ggactgggaa gta 33

[0 1 0 7]

<210>35

<211>33

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

30

<400>35

gtgaaacata ttaaannag ctatacgaga gat 33

[0 1 0 8]

<210>36

<211>33

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

40

<400>36

cttgctgcaa tcgaannnta tttaaataaa aca 33

[0 1 0 9]

<210>37

<211>25

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>37

gatggttggg gggaaattcac tgtaa 25

10

[0 1 1 0]

<210>38

<211>39

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>38

20

ccaacgaatc gttggcaggt aatttcaggt gcctacacg 39

[0 1 1 1]

<210>39

<211>33

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

30

<400>39

attgatgcgt ggacgagttt cgacttttca ggg 33

[0 1 1 2]

<210>40

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

40

<400>40

tttcgacttt ccagggcgta a 21

[0 1 1 3]

<210>41

<211>43

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>41

gggtgtgact gggatcagca atatcaagaa aatcatattt tcc 43

10

[0 1 1 4]

<210>42

<211>42

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>42

20

catattttcc gctttgcaaa tacggnttgg aacagggcgag tg 42

[0 1 1 5]

<210>43

<211>44

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

30

<400>43

aatatcgact ttatgcatcc agatgtacaa gatgagtga agga 44

[0 1 1 6]

<210>44

<211>43

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

40

<400>44

gacgtaggtg ctctcgaatc ttatttagat gaaatgaatt ggg 43

[0 1 1 7]

<210>45

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>45

cgataacatt ccagctaaaa a 21

10

[0 1 1 8]

<210>46

<211>38

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>46

gacctggtgg ttccaagaga atgtatgtag gacgtcag 38

20

[0 1 1 9]

<210>47

<211>42

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

30

<400>47

aatggcgatg gatggggcga tttctttacg aatggaggat ct 42

[0 1 2 0]

<210>48

<211>39

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

40

<400>48

ccaacgaatc gtiggcagnn natttcaggt gcctacacg 39

[0 1 2 1]

<210>49

<211>33

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>49

gttgactggg atgagcgcaa acaagaaaat cat 33

10

【 0 1 2 2 】

<210>50

<211>25

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>50

20

tgatgaaga gttcggtaat tatga 25

【 0 1 2 3 】

<210>51

<211>33

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

30

<400>51

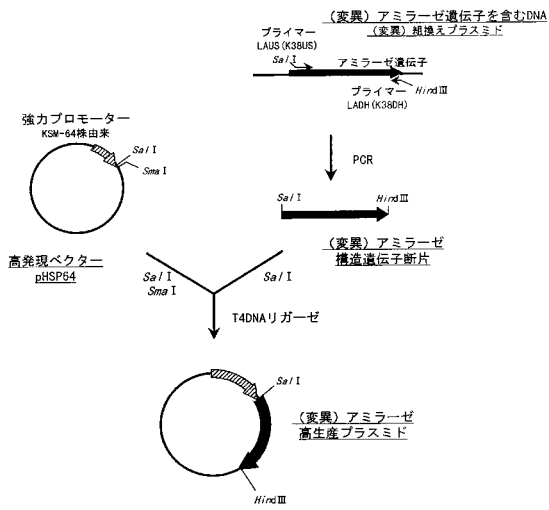
agtcacccag aggtcgtaga tgagttgaag gat 33

【 図面の簡単な説明 】

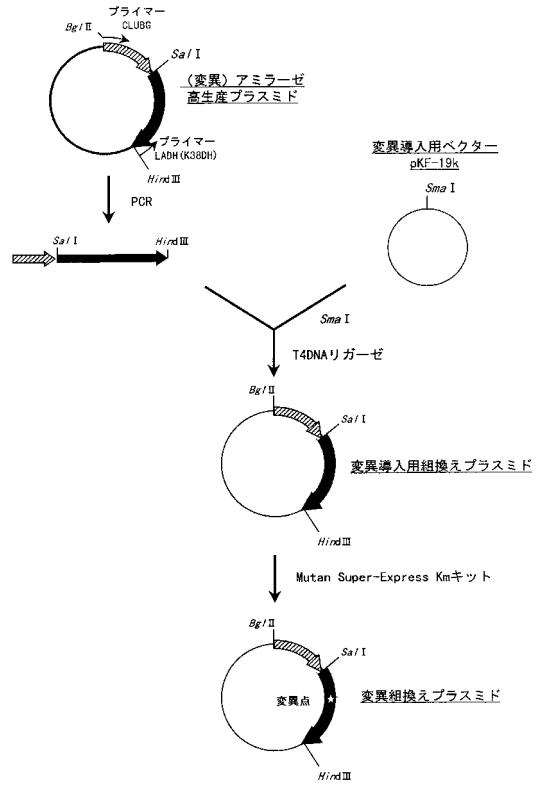
【 図 1 】 K S M - 1 3 7 8 株 或 い は K S M - K 3 8 株 由 来 の - ア ミ ラ ー ゼ 生 産 用 組 換 え
 プラスミドの構築方法を示す図である。

【 図 2 】 K S M - 1 3 7 8 株 或 い は K S M - K 3 8 株 由 来 の - ア ミ ラ ー ゼ 遺 伝 子 へ の 変 異 導 入 方 法 を 示 す 模 式 図 で 有 る 。 40

【図1】



【図2】



フロントページの続き

| | | |
|-------------|-----------------|-----------------------|
| (51)Int.Cl. | | F I |
| C 1 2 N | 5/10 (2006.01) | C 1 2 N 5/00 1 0 1 |
| C 1 1 D | 3/386 (2006.01) | C 1 1 D 3/386 |
| C 1 2 R | 1/07 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 Z N A A |
| | | C 1 2 R 1:07 |
| | | C 1 2 N 9/28 |
| | | C 1 2 R 1:07 |

(74)代理人 100111028
弁理士 山本 博人

(72)発明者 荒木 裕行
栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内

(72)発明者 遠藤 圭二
栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内

(72)発明者 萩原 浩
栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内

(72)発明者 五十嵐 一暁
栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内

(72)発明者 林 康弘
栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内

(72)発明者 尾崎 克也
栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内

審査官 飯室 里美

(56)参考文献 特開 2 0 0 0 - 1 8 4 8 8 2 (J P , A)
国際公開第 9 9 / 0 2 3 2 1 1 (W O , A 1)
国際公開第 9 9 / 0 2 9 8 7 6 (W O , A 1)
国際公開第 9 9 / 0 1 9 4 6 7 (W O , A 1)
特表 2 0 0 0 - 5 0 8 9 1 4 (J P , A)
特開 2 0 0 1 - 0 5 4 3 9 2 (J P , A)
国際公開第 9 8 / 0 4 4 1 2 6 (W O , A 1)
特表平 1 1 - 5 0 0 0 0 3 (J P , A)
j. Appl. Glycosci. , 1 9 9 9 年 , Vol. 46 , p. 199-206

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 15/09-62
C12N 9/28-32
CA/BIOSIS/MEDLINE(STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq
PubMed
WPI
JSTPlus(JDreamII)