

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5140848号
(P5140848)

(45) 発行日 平成25年2月13日(2013.2.13)

(24) 登録日 平成24年11月30日(2012.11.30)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 P 7/42 (2006.01)

C 1 2 P 7/42

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 R 1/185 (2006.01)

C 1 2 P 7/42

C 1 2 R 1/01 (2006.01)

C 1 2 R 1:185

C 1 2 R 1/15 (2006.01)

C 1 2 P 7/42

請求項の数 15 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-234463 (P2007-234463)

(22) 出願日 平成19年9月10日(2007.9.10)

(65) 公開番号 特開2009-65839 (P2009-65839A)

(43) 公開日 平成21年4月2日(2009.4.2)

審査請求日 平成22年7月27日(2010.7.27)

(出願人による申告)平成16、17年度、経済産業省、「地域新生コンソーシアム研究開発事業」、課題「最新型質量分析器を用いた有用水酸化酵素の高速探索法の開発」の成果、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願平成18年度、経済産業省、「戦略的基盤技術高度化支援事業」、課題「機能性化成品を生産する微生物の高速育種法の開発」の成果、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(73) 特許権者 503135546

株式会社ジナリス

神奈川県横浜市鶴見区小野町75番地1

(74) 代理人 100100549

弁理士 川口 嘉之

(74) 代理人 100090516

弁理士 松倉 秀実

(74) 代理人 100089244

弁理士 遠山 勉

(72) 発明者 岩崎 卓己

千葉県木更津市東太田4-22-20 ハ

イツ石山B-202

(72) 発明者 貫井 憲之

千葉県木更津市木更津2-1-17 ホー

ムズ木更津303

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 没食子酸の製造法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の(A)または(B)に記載の蛋白質を発現する微生物を用いてプロトカテク酸から没食子酸を生成、蓄積させ、これを採取することを特徴とする没食子酸の製造方法。

(A) 配列番号16、26、30、32または34で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質

(B) 配列番号16、26、30、32または34で表されるアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入または付加を含むアミノ酸配列からなり、かつプロトカテク酸の5位を酸化する酵素活性を有する蛋白質(配列番号30については385位のフェニルアラニンが置換または欠失した配列を含まない)。

【請求項2】

前記微生物の培養物または該培養物の処理物およびプロトカテク酸を水性媒体中に存在せしめ、該媒体中に没食子酸を生成、蓄積させ、該媒体から没食子酸を採取することを特徴とする請求項1に記載の没食子酸の製造法。

【請求項3】

前記微生物がさらにテレフタル酸からプロトカテク酸を生成する能力を保有する微生物であり、該微生物をテレフタル酸を含有する培地中でテレフタル酸と反応させることにより、没食子酸を生成、蓄積させ、これを採取することを特徴とする請求項1に記載の没食子酸の製造方法。

【請求項4】

前記微生物の培養物または該培養物の処理物およびテレフタル酸を水性媒体中に存在せしめ、該媒体中に没食子酸を生成、蓄積させ、該媒体から没食子酸を採取することを特徴とする請求項 3 に記載の没食子酸の製造法。

【請求項 5】

前記微生物がさらにフタル酸からプロトカテク酸を生成する能力を保有する微生物であり、該微生物をフタル酸を含有する培地中でフタル酸と反応させることにより、没食子酸を生成、蓄積させ、これを採取することを特徴とする請求項 1 に記載の没食子酸の製造方法。

【請求項 6】

前記微生物の培養物または該培養物の処理物およびフタル酸を水性媒体中に存在せしめ、該媒体中に没食子酸を生成、蓄積させ、該媒体から没食子酸を採取することを特徴とする請求項 5 に記載の没食子酸の製造法。

10

【請求項 7】

前記微生物がさらにイソフタル酸からプロトカテク酸を生成する能力を保有する微生物であり、該微生物をイソフタル酸を含有する培地中でイソフタル酸と反応させることにより、没食子酸を生成、蓄積させ、これを採取することを特徴とする請求項 1 に記載の没食子酸の製造方法。

【請求項 8】

前記微生物の培養物または該培養物の処理物およびイソフタル酸を水性媒体中に存在せしめ、該媒体中に没食子酸を生成、蓄積させ、該媒体から没食子酸を採取することを特徴とする請求項 7 に記載の没食子酸の製造法。

20

【請求項 9】

前記微生物がさらにパラヒドロキシ安息香酸からプロトカテク酸を生成する能力を保有する微生物であり、該微生物をパラヒドロキシ安息香酸を含有する培地中でパラヒドロキシ安息香酸と反応させることにより、没食子酸を生成、蓄積させ、これを採取することを特徴とする請求項 1 に記載の没食子酸の製造方法。

【請求項 10】

前記微生物の培養物または該培養物の処理物およびパラヒドロキシ安息香酸を水性媒体中に存在せしめ、該媒体中に没食子酸を生成、蓄積させ、該媒体から没食子酸を採取することを特徴とする請求項 9 に記載の没食子酸の製造法。

30

【請求項 11】

テレフタル酸からプロトカテク酸を生成する能力が、テレフタル酸ジオキシゲナーゼ、テレフタル酸ジオキシゲナーゼ・レダクターゼ、テレフタル酸1,2-ジヒドロジオール ジヒドロゲナーゼおよびテレフタル酸トランスポーターの蛋白質をコードする DNA を形質転換法により導入して得られることを特徴とする、請求項 3 または 4 に記載の没食子酸の製造方法。

【請求項 12】

フタル酸からプロトカテク酸を生成する能力が、テレフタル酸ジオキシゲナーゼ、テレフタル酸ジオキシゲナーゼ・レダクターゼ、テレフタル酸1,2-ジヒドロジオール ジヒドロゲナーゼおよびテレフタル酸トランスポーターの蛋白質をコードする DNA を形質転換法により導入して得られることを特徴とする、請求項 5 または 6 に記載の没食子酸の製造方法。

40

【請求項 13】

イソフタル酸からプロトカテク酸を生成する能力が、イソフタル酸ジオキシゲナーゼ、イソフタル酸ジオキシゲナーゼ・レダクターゼ、イソフタル酸1,2-ジヒドロジオールジヒドロゲナーゼおよびイソフタル酸トランスポーターの蛋白質をコードする DNA を形質転換法により導入して得られることを特徴とする、請求項 7 または 8 に記載の没食子酸の製造方法。

【請求項 14】

前記微生物が、前記 (A) または (B) の蛋白質をコードする DNA が導入された微生物

50

であることを特徴とする、請求項1から13のいずれか1項に記載の没食子酸の製造法。

【請求項15】

微生物がエシェリヒア (*Escherichia*) 属、ロドコッカス (*Rhodococcus*) 属、アシネトバクター (*Acinetobacter*) 属、ブラディリゾビウム (*Bradyrhizobium*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、ロドシュードモナス (*Rhodopseudomonas*) 属、シノリゾビウム (*Sinorhizobium*) 属、ブレヴィバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、ノボスフィンゴビウム (*Novosphingobium*) 属またはラルストニア (*Ralstonia*) 属に属する微生物であることを特徴とする、請求項1から14のいずれか1項に記載の製造法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

抗酸化剤や写真の現像剤として有用な没食子酸を、プロトカテク酸の5位を酸化する酵素活性（以下、プロトカテク酸5位酸化活性という）を有する蛋白質を発現する微生物を用いて工業的に製造する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

没食子酸は、そのアルカリ性水溶液は還元力が強く、還元剤、写真の現像剤に使われる。また、タンニン合成の原料になり、青インクの製造に使われ、さらに、没食子酸プロピル、没食子酸イソアミルなどのエステルとして油脂・バターの酸化防止剤にも使用される。

20

【0003】

酵素を用いた没食子酸の製造法に関しては、野生型酵素を用いた没食子酸の生産については報告例がないが、シュードモナス・エルギノーサ P A O 株が保有する野生型パラヒドロキシ安息香酸水酸化酵素の385位のチロシンをフェニールアラニンに変換した変異酵素（以下、P A O 変異酵素と略記する）を用いることにより、試験管内でパラヒドロキシ安息香酸を出発物質としてプロトカテク酸を経由して没食子酸を生成できることが報告されている〔非特許文献1〕。ただし、P A O 変異酵素のパラヒドロキシ安息香酸水酸化酵素の比活性が、野生型酵素と比べて約50分の1に減少し、没食子酸を合成するプロトカテク酸5位酸化活性も低いことが報告されている。また微生物を用いた没食子酸の製造法に関しては、大腸菌によりグルコースを原料にし、上記 P A O 変異酵素を用いて没食子酸を生産する例が報告されている〔特許文献1、および非特許文献2〕。しかしながら、この例では、原料の一部しか没食子酸に転換しないこと、発酵時間が長いこと、前駆体3-デヒドロキシシキミ酸が大量に蓄積して没食子酸の生産量が頭打ちになっていることなどの理由から、製造コスト面で問題がある。原料として、グルコースでなく、テレフタル酸、フタル酸、イソフタル酸およびパラヒドロキシ安息香酸などの芳香族カルボン酸を用いた場合、酵素変換によりモル数あたり100%近い没食子酸生産も期待できるが、テレフタル酸、フタル酸、イソフタル酸およびパラヒドロキシ安息香酸を原料として微生物を培養して没食子酸を生産できることは報告されていない。

30

【0004】

植物ヌルデの五倍子からの抽出法を用いて没食子酸を製造した場合、製造コストが高ことから、これら化合物を工業的に有利に製造する方法が求められている。フタル酸類（フタル酸、テレフタル酸およびイソフタル酸）は安価な原料である上、テレフタル酸はペットボトルからも再生できることから、安価な原料となる。またバイオマス利用が盛んになっているが、植物を利用してパラヒドロキシ安息香酸を大量生産することも可能となっているので、パラヒドロキシ安息香酸も安価な原料となる。このような背景から、テレフタル酸、フタル酸、イソフタル酸またはパラヒドロキシ安息香酸などの安価な原料から没食子酸を効率よく生産する方法が所望されている。P A O 変異酵素はプロトカテク酸5位酸化活性が低いことから、没食子酸を効率よく生産するためにプロトカテク酸5位酸化活性の向上が所望されている。

40

【特許文献1】 米国特許番号6,472,190

50

【非特許文献1】Entsch, B, Palfey, B.A., Ballou, D. P. と Masey, V. J. Biol. Chem. 266, 17341-17349 (1991)

【非特許文献2】Spiros Kambourakis, K.M. Draths, and J. W. Frost. J. Am. Chem. Soc. 122, 9042-9043 (2000年)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明の課題は、テレフタル酸、フタル酸、イソフタル酸またはパラヒドロキシ安息香酸などの安価な原料からプロトカテク酸を生産し、プロトカテク酸5位酸化活性を持つ蛋白質（以下、プロトカテク酸5位酸化酵素という）によりプロトカテク酸を没食子酸に変換することにより没食子酸を安価に製造する方法を提供することにある。

10

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行い、P A O変異酵素のアミノ酸配列と相同性を有する野生型蛋白質の酵素活性を調べたところ、P A O変異酵素のアミノ酸配列に対して40. 1%以上かつ75. 0%未満の相同性を有する、配列番号6, 10, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26および28で表されるアミノ酸配列を有する野生型蛋白質について強いプロトカテク酸5位酸化活性を有することを見出した。続いて、相互に39. 1~58. 9%の相同性を有する配列番号16, 26, 30, 32および34で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質のプロトカテク酸5位酸化活性を測定し、P A O変異酵素の活性と比較したところ、野生型蛋白質でもP A O変異酵素よりもプロトカテク酸5位酸化活性の比活性が2倍以上高いことを見出した。

20

【0007】

配列番号16で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA断片を含む組換えベクターを構築した後、該組換えベクターで形質転換した大腸菌を調製したところ、パラヒドロキシ安息香酸を原料として没食子酸を効率よく生産させることに成功した。

【0008】

次に、テレフタル酸ジオキシゲナーゼ、テレフタル酸ジオキシゲナーゼ・レダクターゼ、テレフタル酸1,2-ジヒドロジオール ジヒドロゲナーゼおよびテレフタル酸トランスポーターの蛋白質をコードするDNAをロドコッカス属RHA1株よりクローニングして、組換えベクターを構築した。該組換えベクター、および配列番号16または30で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を発現するベクターを用いて大腸菌を形質転換することにより、テレフタル酸代謝能を獲得した形質転換体を調製した。続いて該形質転換体を利用してテレフタル酸を原料として没食子酸を効率よく生産させることに成功し、本発明を完成するに至った。

30

【0009】

すなわち、本発明は以下の(1)~(15)に関する。

【0010】

(1) 以下の(A)または~(B)に記載の蛋白質を発現する微生物を用いてプロトカテク酸から没食子酸を生成、蓄積させ、これを採取することを特徴とする没食子酸の製造方法。

40

(A) 配列番号16, 26, 30, 32または34で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質

(B) 配列番号16, 26, 30, 32または34で表されるアミノ酸配列において、1個以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入または付加を含むアミノ酸配列からなり、かつプロトカテク酸の5位を酸化する酵素活性を有する蛋白質（配列番号30については385位のフェニルアラニンが置換または欠失した配列を含まない）。

【0011】

(2) 微生物の培養物または該培養物の処理物およびプロトカテク酸を水性媒体中に存在せしめ、該媒体中に没食子酸を生成、蓄積させ、該媒体から没食子酸を採取することを特

50

徴とする前記（１）の没食子酸の製造法。

【００１２】

（３）前記微生物がテレフタル酸からプロトカテク酸を生成する能力を保有する微生物であり、該微生物をテレフタル酸を含有する培地中でテレフタル酸と反応させることにより、没食子酸を生成、蓄積させ、これを採取することを特徴とする前記（１）の没食子酸の製造方法。

【００１３】

（４）前記微生物の培養物または該培養物の処理物およびテレフタル酸を水性媒体中に存在せしめ、該媒体中に没食子酸を生成、蓄積させ、該媒体から没食子酸を採取することを特徴とする前記（３）の没食子酸の製造法。

10

【００１４】

（５）前記微生物がフタル酸からプロトカテク酸を生成する能力を保有する微生物であり、該微生物をフタル酸を含有する培地中でフタル酸と反応させることにより、没食子酸を生成、蓄積させ、これを採取することを特徴とする前記（１）の没食子酸の製造方法。

【００１５】

（６）前記微生物の培養物または該培養物の処理物およびフタル酸を水性媒体中に存在せしめ、該媒体中に没食子酸を生成、蓄積させ、該媒体から没食子酸を採取することを特徴とする前記（５）の没食子酸の製造法。

【００１６】

（７）前記微生物がイソフタル酸からプロトカテク酸を生成する能力を保有する微生物であり、該微生物をイソフタル酸を含有する培地中でイソフタル酸と反応させることにより、没食子酸を生成、蓄積させ、これを採取することを特徴とする前記（１）の没食子酸の製造方法。

20

【００１７】

（８）前記微生物の培養物または該培養物の処理物およびイソフタル酸を水性媒体中に存在せしめ、該媒体中に没食子酸を生成、蓄積させ、該媒体から没食子酸を採取することを特徴とする前記（７）の没食子酸の製造法。

【００１８】

（９）前記微生物がパラヒドロキシ安息香酸からプロトカテク酸を生成する能力を保有する微生物であり、該微生物をパラヒドロキシ安息香酸を含有する培地中でパラヒドロキシ安息香酸と反応させることにより、没食子酸を生成、蓄積させ、これを採取することを特徴とする前記（１）の没食子酸の製造方法。

30

【００１９】

（１０）前記微生物の培養物または該培養物の処理物およびパラヒドロキシ安息香酸を水性媒体中に存在せしめ、該媒体中に没食子酸を生成、蓄積させ、該媒体から没食子酸を採取することを特徴とする前記（９）の没食子酸の製造法。

【００２０】

（１１）テレフタル酸からプロトカテク酸を生成する能力が、テレフタル酸ジオキシゲナーゼ、テレフタル酸ジオキシゲナーゼ・レダクターゼ、テレフタル酸1,2-ジヒドロジオール ジヒドロゲナーゼおよびテレフタル酸トランスポーターの蛋白質をコードするDNAを形質転換法により導入して得られることを特徴とする、前記（３）または（４）記載の没食子酸の製造方法。

40

【００２１】

（１２）フタル酸からプロトカテク酸を生成する能力が、テレフタル酸ジオキシゲナーゼ、テレフタル酸ジオキシゲナーゼ・レダクターゼ、テレフタル酸1,2-ジヒドロジオール ジヒドロゲナーゼおよびテレフタル酸トランスポーターの蛋白質をコードするDNAを形質転換法により導入して得られることを特徴とする、前記（５）または（６）記載の没食子酸の製造方法。

【００２２】

（１３）イソフタル酸からプロトカテク酸を生成する能力が、イソフタル酸ジオキシゲナ

50

ーゼ、イソフタル酸ジオキシゲナーゼ・レダクターゼ、イソフタル酸1,2-ジヒドロジオールジヒドロゲナーゼおよびイソフタル酸トランスポーターの蛋白質をコードするDNAを形質転換法により導入して得られることを特徴とする、前記(7)または(8)記載の没食子酸の製造方法。

【0023】

(14) 前記微生物が、前記(A)または(B)に記載の蛋白質をコードするDNAが導入された微生物である、前記(1)から(13)のいずれか1項に記載の没食子酸の製造法。

【0024】

(15) 微生物がエシェリヒア (*Escherichia*) 属、ロドコッカス (*Rhodococcus*) 属、アシネトバクター (*Acinetobacter*) 属、ブラディリゾビウム (*Bradyrhizobium*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、ロドシュードモナス (*Rhodopseudomonas*) 属、シノリゾビウム (*Sinorhizobium*) 属、ブレビバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、ノボスフィンゴビウム (*Novosphingobium*) 属またはラルストニア (*Ralstonia*) 属に属する微生物であることを特徴とする、前記(1)から(14)のいずれか1項に記載の製造法。

【発明の効果】

【0025】

本発明によれば、プロトカテク酸5位酸化活性が優れた酵素蛋白質を用いて、プロトカテク酸、テレフタル酸、フタル酸、イソフタル酸またはパラヒドロキシ安息香酸を原料として没食子酸を安価に製造する方法を提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0026】

以下に本発明を詳細に説明する。

【0027】

本発明で用いられるプロトカテク酸5位酸化酵素蛋白質としては、配列番号4で表されるアミノ酸配列を有するPAO変異酵素よりもプロトカテク酸5位酸化酵素の比活性が2倍以上優れている蛋白質があげられる。例えば、配列番号16、26、30、32または34で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質が挙げられる。ここで、配列番号16はシュードモナス・プチダKT2440由来の野生型プロトカテク酸5位酸化酵素のアミノ酸配列である。配列番号26はノボスフィンゴビウム・アロマティカボランスDSM 12444由来の野生型プロトカテク酸5位酸化酵素のアミノ酸配列である。また、配列番号16においては、PAO変異酵素の変異点に対応する386位のTyrがPheに置換されてもよく、配列番号16においてY386Fの変異が導入されたアミノ酸配列を配列番号32に示す。また、配列番号26においては、PAO変異酵素の変異点に対応する384位のTyrがPheに置換されてもよく、配列番号26においてY384Fの変異が導入されたアミノ酸配列を配列番号34に示す。配列番号30はコリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032由来の野生型プロトカテク酸5位酸化酵素のアミノ酸配列において、PAO変異酵素の変異点に対応する385位のTyrがPheに置換された配列である。

本発明で用いられるプロトカテク酸5位酸化酵素蛋白質としてはまた、配列番号16、26、30、32または34のアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸配列からなり、かつプロトカテク酸5位酸化酵素活性を有する蛋白質をあげることができる。ただし、配列番号30のアミノ酸配列においては、385位のフェニルアラニンが保存されている必要があるため、385位のフェニルアラニンが欠失または置換した配列は含まない。

好ましくは、配列番号16、26、30、32および34で表される蛋白質が配列番号4で表されるPAO変異酵素よりも酵素活性が優れている原因は、配列番号4のアミノ酸配列と配列番号16、26、30、32および34のいずれかのアミノ酸配列の間の違いから由来しているため、これらアミノ酸配列の違いに基づいて配列番号16、26、30、32または34のアミノ酸配列において1または数個のアミノ酸が欠失、置換または付加

したアミノ酸配列からなり、かつプロトカテク酸 5 位酸化酵素活性を有する蛋白質をあげることができる（配列番号 30 については 385 位のフェニルアラニンが置換または欠失した配列を含まない）。また、該蛋白質として、配列番号 16、26、30、32 および 34 のいずれかのアミノ酸配列と 75% 以上の相同性、好ましくは 90% 以上特に好ましくは 95% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつプロトカテク酸 5 位酸化酵素活性を有する蛋白質（配列番号 30 については 385 位のフェニルアラニンが置換または欠失した配列を含まない）をあげることができる。さらに、相互に 37.8～58.9% の相同性を有する配列番号 16、26、30、32 および 34 で表される蛋白質が配列番号 4 で表される PAO 変異酵素よりもプロトカテク酸 5 位酸化酵素の比活性が 2 倍以上優れていることを本発明で見出したので、配列番号 16、26、30、32 および 34 で表される蛋白質のいずれかの蛋白質との相同性が 75.0% 以下であっても、37.8% 以上であれば、PAO 変異酵素よりもプロトカテク酸 5 位酸化酵素活性が 2 倍以上優れている酵素が容易に見出すことができる。したがって、本発明に関わるプロトカテク酸 5 位酸化酵素蛋白質としては、配列番号 16、26、30、32 および 34 で表されるアミノ酸配列と 37.8～75.0% の相同性を有し、配列番号 4 とは異なるアミノ酸配列からなり、かつプロトカテク酸の 5 位を酸化する酵素活性を有する蛋白質であってもよい。

【0028】

上記の 1 または数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつプロトカテク酸 5 位酸化酵素活性を有する蛋白質は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)（以下、モレキュラー・クローニング第 2 版と略す）、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)（以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す）、Nucleic Acids Res., 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Res., 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 488 (1985) 等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば配列番号 16、26、30、32 および 34 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする DNA に部位特異的変異を導入することにより取得することができる。欠失、置換または付加される 1 または数個というアミノ酸の数はプロトカテク酸 5 位酸化酵素活性が維持される限り特に限定されないが、配列番号 4 のアミノ酸配列と配列番号 16、26、30、32 および 34 のいずれかのアミノ酸配列の間の違いの個数以内であることが望ましく、1～20 個が好ましく、1～10 個がより好ましく、1～5 個が特に好ましい。

【0029】

本発明で用いられる微生物は、上記のプロトカテク酸 5 位酸化酵素蛋白質を発現する微生物である。例えば、アシネトバクター (*Acinetobacter*) 属、ブラディリゾビウム (*Bradyrhizobium*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、ロドシュードモナス (*Rhodopseudomonas*) 属、シノリゾビウム (*Sinorhizobium*) 属、ブレビバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、ノボスフィンゴビウム (*Novosphingobium*) 属またはラルストニア (*Ralstonia*) 属に属する微生物などの微生物株から上記の特性を有するものを天然から単離することにより得られる。または、このような特性を有する微生物をアメリカ・タイプ・カルチャー・コレクション（以下、必要に応じて ATCC と略記する）、独立行政法人製品基盤技術基盤機構・生物遺伝資源部門（以下、必要に応じて NBRC と略記する）、または独立行政法人 理化学研究所 筑波研究所 バイオリソースセンターなどから入手することができる。

【0030】

具体的には、アシネトバクター (*Acinetobacter*) 属の微生物としては、例えばアシネトバクター・カルコアセチカス (*Acinetobacter calcoaceticus*) ADP1 等をあげることができる。ブラディリゾビウム (*Bradyrhizobium*) 属の微生物としては、例えばブラディリゾビウム・ジャポニカム (*Bradyrhizobium japonicum*) USDA110 等をあげることができる。コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属の微生物としては、例えばコリネバクテリ

ウム・グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) ATCC13032等をあげることができる。シュードモナス (Pseudomonas) 属の微生物としては、例えばシュードモナス・プチダ (Pseudomonas putida) KT2440等をあげることができる。ロドシュードモナス (Rhodopseudomonas) 属の微生物としては、例えばロドシュードモナス・パルストリス (Rhodopseudomonas palustris) CGA009等をあげることができる。シノリゾビウム (Sinorhizobium) 属の微生物としては、例えばシノリゾビウム・メリロティ (Sinorhizobium meliloti) 1021等をあげることができる。ブレビバクテリウム (Brevibacterium) 属の微生物としては、例えばブレビバクテリウム・リネンズ (Brevibacterium linens) BL2等をあげることができる。ノボスフィンゴビウム (Novosphingobium) 属の微生物としては、例えばノボスフィンゴビウム・アロマティカボランス (Novosphingobium aromaticivorans) DSM 12444等をあげることができる。ラルストニア (Ralstonia) 属の微生物としては、例えばラルストニア・メタリデュランス (Ralstonia metallidurans) CH34等をあげることができる。ただし、本発明に使用できる菌株は本菌株に限定されるものではなく、その目的を達成できる菌株であればすべて使用できる。

【0031】

本発明で用いられる微生物は、上記のプロトカテク酸5位酸化酵素蛋白質をコードするDNAを含有する組換え体DNAで形質転換した微生物であってもよい。本発明に使用できるプロトカテク酸5位酸化酵素蛋白質を生産する形質転換体は、例えば該DNAをモレキュラー・クローニング第2版に記載の方法に従って、上記の微生物から該蛋白質をコードするDNAをクローニングし、ベクターDNAと連結することで組換え体DNAを作製し、該組換え体DNAを用いて宿主細胞を形質転換することにより取得することができる。以下に、DNAのクローニングと形質転換株の作製方法について詳しく述べる。

【0032】

上記のアシネトバクター (Acinetobacter) 属、ブラディリゾビウム (Bradyrhizobium) 属、コリネバクテリウム (Corynebacterium) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属、ロドシュードモナス (Rhodopseudomonas) 属、シノリゾビウム (Sinorhizobium) 属、ブレビバクテリウム (Brevibacterium) 属、ノボスフィンゴビウム (Novosphingobium) 属またはラルストニア (Ralstonia) 属に属する微生物を公知の方法により培養する。培養後、公知の方法 (例えば、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーに記載の方法) により、該微生物の染色体DNAを単離精製する。この染色体DNAから合成DNAを用いて、ハイブリダイゼーション法またはPCR法などによりプロトカテク酸5位酸化酵素蛋白質をコードするDNAを含む断片を取得することができる。なお、該合成DNAは、アシネトバクター (Acinetobacter) 属、ブラディリゾビウム (Bradyrhizobium) 属、コリネバクテリウム (Corynebacterium) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属、ロドシュードモナス (Rhodopseudomonas) 属、シノリゾビウム (Sinorhizobium) 属、ブレビバクテリウム (Brevibacterium) 属、ノボスフィンゴビウム (Novosphingobium) 属またはラルストニア (Ralstonia) 属の細菌由来のプロトカテク酸5位酸化酵素蛋白質をコードする遺伝子 (以下、プロトカテク酸5位酸化酵素遺伝子と呼ぶ)、好ましくはアシネトバクター・カルコアセティカス (Acinetobacter calcoaceticus)、ブラディリゾビウム・ジャポニカム (Bradyrhizobium japonicum)、コリネバクテリウム・グルタミカム (Corynebacterium glutamicum)、シュードモナス・プチダ (Pseudomonas putida)、ロドシュードモナス・パルストリス (Rhodopseudomonas palustris)、シノリゾビウム・メリロティ (Sinorhizobium meliloti)、ノボスフィンゴビウム・アロマティカボランス (Novosphingobium aromaticivorans)、ラルストニア・メタリデュランス (Ralstonia metallidurans)、またはブレビバクテリウム・リネンズ (Brevibacterium linens) 由来のプロトカテク酸5位酸化酵素遺伝子の塩基配列に基づいて設計することができる。具体的には、アシネトバクター・カルコアセティカス (Acinetobacter calcoaceticus) ADP1、ブラディリゾビウム・ジャポニカム (Bradyrhizobium japonicum) USDA110、コリネバクテリウム・グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) ATCC13032、シュードモナス・プチダ (Pseudomonas putida) KT2440、ロドシ

ュードモナス・パルストリス (*Rhodopseudomonas palustris*) CGA009、シノリゾビウム・メリロティ (*Sinorhizobium meliloti*) 1021、ブレビバクテリウム・リネンズ (*Brevibacterium linens*) BL2、ノボスフィンゴビウム・アロマティカボランス (*Novosphingobium aromaticivorans*) DSM 12444またはラルストニア・メタリデュランス (*Ralstonia metallidurans*) CH34のプロトカテク酸 5 位酸化酵素遺伝子の塩基配列、すなわち配列番号 5、9、13、15、17、19、21、23、25および27で表される塩基配列に基づいて設計することができる。

【0033】

上記のプロトカテク酸 5 位酸化酵素遺伝子の DNA を連結するベクターとしては、エシェリヒア・コリ K12 株などにおいて自立複製可能なベクターであればプラスミドベクター、ファージベクター等いずれも使用可能であるが、具体的には、pUC19 [Gene, 33, 103 (1985)]、pUC18、pBR322、pHelix1 (ロシュ・ダイアグノスティクス社製)、ZAP Express [ストラタジーン社製、Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [ストラタジーン社製、Nucleic Acids Res., 17, 9494 (1989)]、pUC118 (タカラバイオ社製) 等を用いることができる。

10

【0034】

該ベクターに上記で取得した DNA を連結して得られる組換え体 DNA の宿主に用いるエシェリヒア・コリは、エシェリヒア・コリに属する微生物であればいずれでも用いることができるが、具体的には、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) XL1-Blue MRF' [ストラタジーン社製、Strategies, 5, 81 (1992)]、エシェリヒア・コリ C600 [Genetics, 39, 440 (1954)]、エシェリヒア・コリ Y1088 [Science, 222, 778 (1983)]、エシェリヒア・コリ Y1090 [Science, 222, 778 (1983)]、エシェリヒア・コリ NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、エシェリヒア・コリ K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)]、エシェリヒア・コリ JM105 [Gene, 38, 275 (1985)]、エシェリヒア・コリ JM109、エシェリヒア・コリ BL21 等をあげることができる。

20

【0035】

ロドコッカス (*Rhodococcus*) 属、アシネトバクター (*Acinetobacter*) 属、ブラディリゾビウム (*Bradyrhizobium*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、ロドシュードモナス (*Rhodopseudomonas*) 属、シノリゾビウム (*Sinorhizobium*) 属、ブレビバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、ノボスフィンゴビウム (*Novosphingobium*) 属またはラルストニア (*Ralstonia*) 属に属する微生物の中に、プロトカテク酸 5 位酸化酵素遺伝子を導入するときは、これら微生物の中で自立複製可能なベクターを用いる。好ましくは、該微生物のいずれかとエシェリヒア・コリ K12 株の両方の微生物の中で自立複製可能なシャトル・ベクターを用いて、組換え体 DNA を宿主となる該微生物に導入することができる。

30

【0036】

組換え体 DNA の導入方法としては、上記宿主細胞へ DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、エレクトロポレーション法 [Nucleic Acids Res., 16, 6127 (1988)] 等をあげることができる。

40

【0037】

上記のようにして得られた形質転換体から組換え体 DNA を抽出し、該組換え DNA に含まれる本発明の DNA の塩基配列を決定することができる。塩基配列の決定には、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)] または 3730xl 型 DNA アナライザー (アプライド・バイオシステムズ社製) 等の塩基配列分析装置を用いることができる。

【0038】

また、上記において決定された DNA の塩基配列に基づいて、パーセプティブ・バイオシステムズ社製 8905 型 DNA 合成装置等を用いて化学合成することによっても目的とする DNA を調製することもできる。

50

【0039】

上記のプロトカテク酸5位酸化酵素蛋白質を発現する形質転換体は、下記の方法を用いて上記のDNAを宿主細胞中で発現させることによって得られる。

【0040】

上記のプロトカテク酸5位酸化酵素蛋白質をコードするDNAを用いる際には、必要に応じて、本発明の蛋白質をコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製することができる。また、該蛋白質をコードする部分の塩基配列を、宿主の発現に最適なコドンとなるように、塩基を置換することにより、該蛋白質の生産率を向上させることもできる。本発明のDNAを発現する形質転換体は、上記DNA断片を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換え体DNAを作製し、該組換え体DNAを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより取得することができる。

10

【0041】

プロトカテク酸5位酸化酵素蛋白質を発現させる宿主としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。

好ましくは、テレフタル酸、フタル酸またはイソフタル酸またはパラヒドロキシ安息香酸の代謝能（テレフタル酸、フタル酸またはイソフタル酸またはパラヒドロキシ安息香酸からプロトカテク酸を生成する能力）を有する微生物を用いることができる。より好ましくは、テレフタル酸、フタル酸、イソフタル酸またはパラヒドロキシ安息香酸の代謝能を有するエシェリヒア属 (*Escherichia*)、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、ロドコッカス (*Rhodococcus*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、コマモナス (*Comamonas*) 属、バチルス属 (*Bacillus*)、マイコバクテリウム (*Mycobacterium*) 属、ノボスフィンゴビウム (*Novosphingobium*) 属またはバークホルデリア (*Burkholderia*) 属の細菌をあげることができる。さらに好ましくは、テレフタル酸の代謝能を有するロドコッカス属細菌RHA1とコマモナス・テストステロニ (*Comamonas testosteroni*) E6をあげることができる。このような微生物にプロトカテク酸5位酸化酵素蛋白質を発現させることにより、テレフタル酸、フタル酸、イソフタル酸またはパラヒドロキシ安息香酸からプロトカテク酸を経て没食子酸を製造することができる。すなわち、テレフタル酸、フタル酸、イソフタル酸またはパラヒドロキシ安息香酸の代謝能を有し、かつ、プロトカテク酸5位酸化酵素蛋白質を発現する微生物を、それぞれ、テレフタル酸、フタル酸、イソフタル酸またはパラヒドロキシ安息香酸を含有する培地中でこれらの化合物と反応させることにより、テレフタル酸、フタル酸、イソフタル酸またはパラヒドロキシ安息香酸から生成したプロトカテク酸から没食子酸を得ることができる。

20

30

なお、テレフタル酸、フタル酸、イソフタル酸またはパラヒドロキシ安息香酸からプロトカテク酸を生成するプロセスは別の微生物を用いて行ってもよい。すなわち、テレフタル酸、フタル酸、イソフタル酸またはパラヒドロキシ安息香酸の代謝能を有する微生物によってテレフタル酸、フタル酸、イソフタル酸またはパラヒドロキシ安息香酸から生成したプロトカテク酸を、プロトカテク酸5位酸化酵素蛋白質を発現する微生物と反応させて没食子酸を得る方法も本発明の没食子酸の製造方法に含まれる。

【0042】

40

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能なしは染色体中への組込が可能で、本発明のDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

【0043】

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合は、本発明のDNAを含有してなる組換え体DNAは原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明のDNA、転写終結配列、より構成された組換え体DNAであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

【0044】

プロトカテク酸5位酸化酵素蛋白質、または、該蛋白質と他の蛋白質との融合蛋白質をコ

50

ードするDNAを大腸菌などの微生物に導入し、発現するためのベクターとしては、いわゆるマルチコピー型のものが好ましく、ColE1由来の複製開始点を有するプラスミド、例えばpUC系のプラスミドやpBR322系のプラスミドあるいはその誘導体が挙げられる。ここで、「誘導体」とは、塩基の置換、欠失、挿入、付加および／または逆位などによってプラスミドに改変を施したものを意味する。なお、ここでいう改変とは、変異剤やUV照射などによる変異処理、あるいは自然変異などによる改変をも含む。より具体的には、ベクターとしては、例えば、pUC19 [Gene, 33, 103 (1985)]、pUC18、pBR322、pHelix1 (ロシュ・ダイアグノスティクス社製)、pKK233-2 (アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製)、pSE280 (インビトロジェン社製)、pGEMEX-1 (プロメガ社製)、pQE-8 (キアゲン社製)、pET-3 (ノバジェン社製) pBluescriptII SK(+), pBluescript II KS(+) (ストラタジーン社製)、pSTV28 (タカラバイオ社製)、pUC118 (タカラバイオ社製) 等を用いることができる。

10

【0045】

プロモーターとしては、大腸菌 (エシェリヒア・コリ) 等の宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター (Ptrp)、lacプロモーター (Plac)、PLプロモーター、PRプロモーター等の、T7プロモーターなどの大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、及びtacプロモーター、lacT7プロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

【0046】

リボソーム結合配列であるシャイン・ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば5~18塩基) に調節したプラスミドを用いることが好ましい。本発明の組換え体DNAにおいては、本発明のDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

20

【0047】

組換え体DNAの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69, 2110 (1972)]、エレクトロポレーション法 [Nucleic Acids Res., 16, 6127 (1988)]、接合伝達法 [J. G. C. Ottow, Ann. Rev. Microbiol., Vol.29, p.80 (1975)]、細胞融合法 [M.H. Gabor, J. Bacteriol., Vol.137, p.1346 (1979)] 等をあげることができる。

30

【0048】

本発明で用いられるテレフタル酸、フタル酸またはイソフタル酸またはパラヒドロキシ安息香酸の代謝能 (テレフタル酸、フタル酸、イソフタル酸またはパラヒドロキシ安息香酸からプロトカテク酸を生成する能力) を有する微生物は、自然界からのサンプルをもとに、テレフタル酸、フタル酸、イソフタル酸またはパラヒドロキシ安息香酸を炭素源とする集積培養法を用いて取得することができる。好ましくは、テレフタル酸、フタル酸、イソフタル酸またはパラヒドロキシ安息香酸の代謝能を有するシュードモナス属、ロドコッカス属、コマモナス属、バチルス属、マイコバクテリウム属、ノボスフィンゴビウム属またはバークホルデルリア属の細菌をあげることができる。より好ましくは、プロトカテク酸5位酸化酵素蛋白質を発現しているロドコッカス属RHA1をあげることができる。

40

なお、後述の実施例に示されるように、プロトカテク酸5位酸化酵素蛋白質を発現する微生物はパラヒドロキシ安息香酸からプロトカテク酸を生成する能力も有しているため、プロトカテク酸5位酸化酵素蛋白質を発現させた微生物をパラヒドロキシ安息香酸を含む培地で培養することにより、パラヒドロキシ安息香酸から没食子酸を製造することができる。

【0049】

本発明で用いられるテレフタル酸の代謝能 (テレフタル酸からプロトカテク酸を生成する能力) を有する微生物は、テレフタル酸からプロトカテク酸への代謝に関わるテレフタル酸ジオキシゲナーゼ、テレフタル酸ジオキシゲナーゼ・レダクターゼ、およびテレフタル酸1,2-ジヒドロジオール ジヒドロゲナーゼおよびテレフタル酸トランスポーターの蛋白質

50

を生産する能力を有する微生物を挙げることができる。

本発明で用いられるフタル酸の代謝能（フタル酸からプロトカテク酸を生成する能力）を有する微生物は、フタル酸ジオキシゲナーゼ、フタル酸ジオキシゲナーゼ・レダクターゼ、フタレート4,5-シス-ジヒドロキシジオール・ジヒドロゲナーゼ、4,5-ジヒドロキシフタレート脱炭酸酵素およびフタル酸トランスポーターの蛋白質を生産する能力を有する微生物を挙げることができる。

また本発明で用いられるイソフタル酸の代謝能（イソフタル酸からプロトカテク酸を生成する能力）を有する微生物は、イソフタル酸ジオキシゲナーゼ、イソフタル酸ジオキシゲナーゼ・レダクターゼ、イソフタル酸1,2-ジヒドロジオールジヒドロゲナーゼおよびイソフタル酸トランスポーターの蛋白質を生産する能力を有する微生物を挙げることができる。これらの蛋白質を生産する能力を有する微生物は、これらの蛋白質をコードするDNAを組換えDNA技術法を用いて単離した後、上記のプロトカテク酸5位酸化酵素蛋白質を発現する形質転換体を取得する方法と同じ方法を用いて取得することもできる。

【0050】

以上のようにして得られる本発明の微生物を、好ましくは1mM～1Mのプロトカテク酸、テレフタル酸、フタル酸、イソフタル酸またはパラヒドロキシ安息香酸を含有する培地で培養し、培養物中に没食子酸を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、没食子酸を製造することができる。本発明の微生物を培地に培養する方法は、微生物の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

【0051】

本発明の微生物の培養は、炭素源、窒素源、無機塩、各種ビタミン等を含む通常の栄養培地で行うことができ、炭素源としては、例えばブドウ糖、ショ糖、果糖等の糖類、エタノール、メタノール等のアルコール類、クエン酸、リンゴ酸、コハク酸等の有機酸類、廃糖蜜等が用いられる。窒素源としては、例えばアンモニア、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、尿素等がそれぞれ単独または混合して用いられる。また、無機塩としては、例えばリン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸マグネシウム等が用いられる。この他にペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステイープリカー、カザミノ酸、ビオチン等の各種ビタミン等の栄養素を培地に添加することができる。没食子酸を生産するための原料としては、プロトカテク酸、テレフタル酸、フタル酸、イソフタル酸またはパラヒドロキシ安息香酸を添加する。

【0052】

培養は、通常、通気攪拌、振とう等の好気条件下で行う。培養温度は、本発明の微生物が生育し得る温度であれば特に制限はなく、また、培養途中のpHについても本発明の微生物が生育し得るpHであれば特に制限はない。培養中のpH調整は、酸またはアルカリを添加して行うことができる。

【0053】

本発明の微生物を培養した後、プロトカテク酸、テレフタル酸、フタル酸、イソフタル酸もしくはパラヒドロキシ安息香酸のいずれかを含む水性媒体中に、該微生物の培養物もしくは該培養物の処理物を加えることにより、該媒体中に没食子酸を生成、蓄積させ、該媒体から没食子酸を採取することもできる。

【0054】

該培養物の処理物として、本発明の微生物を担体に固定化したものを用いてもよい。その場合には、培養物から回収されたまま、あるいは適当な緩衝液、例えば0.02～0.2M程度のリン酸緩衝液（pH6～10）等で洗浄された菌体を使用することができる。また、培養物から回収された菌体を、超音波、圧搾等の手段で破碎して得られる破碎物、該破碎物を水等で抽出して得られるプロトカテク酸5位酸化酵素蛋白質を含有する抽出物、該抽出物を更に硫酸塩析、カラムクロマトグラフィー等の処理を行って得られるプロトカテク酸5位酸化酵素蛋白質の部分精製成分等を担体に固定化したものも、本発明の没食子酸の製造に使用することができる。

【0055】

これら菌体、菌体破砕物、抽出物または精製酵素の固定化は、それ自体既知の通常用いられている方法に従い、アクリルアミドモノマー、アルギン酸、またはカラギーナン等の適当な担体に菌体等を固定化させる方法により行うことができる。

【0056】

反応に用いる水性媒体は、プロトカテク酸を含有する水溶液または適当な緩衝液、例えば0.02～0.2 M程度のリン酸緩衝液（pH 6～10）とすることができる。この水性媒体には、さらに菌体の細胞膜の物質透過性を高める必要のあるときには、トルエン、キシレン、非イオン性界面活性剤等を0.05～2.0 %（w/v）添加することもできる。

【0057】

水性媒体中の反応原料となるプロトカテク酸、テレフタル酸、フタル酸、イソフタル酸またはパラヒドロキシ安息香酸の濃度は、0.1 mM～1 M程度が適当である。上記の水性媒体における酵素反応温度およびpHは特に限定されないが、通常10～60℃、好ましくは15～50℃が適当であり、反応液中のpHは5～10、好ましくは6～9付近とすることができる。また、pHの調整は、酸またはアルカリを添加して行うことができる。発明で使用する酵素は、菌体抽出液をそのまま又はそれから遠心分離、濾過等で集め、これを水又は緩衝液に懸濁して得ることができる。このようにして得られた酵素をプロトカテク酸、テレフタル酸、フタル酸、イソフタル酸またはパラヒドロキシ安息香酸と水の存在下、反応させるが、反応液中のプロトカテク酸、テレフタル酸、フタル酸、イソフタル酸またはパラヒドロキシ安息香酸の濃度は酵素の活性を阻害しない範囲で可能な限り高くするの有利である。反応は静置、攪拌、振盪のいずれの方法で行ってもよい。また、酵素を適当な支持体に固定化してカラムに充填し、プロトカテク酸、テレフタル酸、フタル酸、イソフタル酸またはパラヒドロキシ安息香酸を含む溶液を流す方法も利用できる。反応は、通常10～60℃、好ましくは15～50℃、pH 5～9、好ましくはpH 6～8で行う。

【0058】

なお、上記水性媒体には、反応時に酸化剤を添加すると、没食子酸の生成収率が一層向上する場合がある。酸化剤としては、亜硝酸ナトリウム、亜硝酸カリウム等の硝酸塩、塩化第二鉄等の金属塩、ハロゲン、ペルオクソ酸等が挙げられ、好ましくは、亜硝酸ナトリウム、塩化第二鉄が挙げられる。添加濃度は、酸化剤の種類によって異なるが、没食子酸の生成を阻害しない濃度で加えることが望ましく、通常0.001～0.05 %（W/V）、好ましくは0.005～0.02 %である。

【0059】

培養終了後の培養液または反応液中からの没食子酸は、酢酸エチル等の有機溶剤によって抽出することにより単離・精製することができる。また、必要に応じて遠心分離等により該培養液から菌体等の不溶成分を除いた後、例えば、活性炭を用いる方法、イオン交換樹脂を用いる方法、結晶化法、沈殿法等の方法を単独でまたは組み合わせることによって没食子酸を採取することができる。

【0060】

以下に本発明の方法を実施例により具体的に述べるが、本発明はこれに限定されるものではない。

【0061】

実施例1. 没食子酸合成活性を有する野生型水酸化酵素を下記のようにして同定した。

（1）シュードモナス・アルギノサPA0株のパラヒドロキシ安息香酸水酸化酵素のアミノ酸配列と相同性を有する蛋白質のデータベース検索

シュードモナス・アルギノサPA0株のパラヒドロキシ安息香酸水酸化酵素は、パラヒドロキシ安息香酸を酸化してプロトカテク酸を生成する活性を保有するが、プロトカテク酸5位酸化活性を生成する活性は全く保有していないことが知られている〔Entsch, B, Palfe y, B.A., Ballou, D. P. と Masey, V. J. Biol. Chem. 266, 17341-17349 (1991)〕。当該水酸化酵素と相同性を有するが、その相同性の値が大きくない蛋白質の中に、シュード

10

20

30

40

50

モナス・アルギノサPA0株のパラヒドロキシ安息香酸水酸化酵素とは異なる活性、すなわちプロトカテク酸5位酸化活性を保有する蛋白質があるか調べてみることにした。具体的には、当該水酸化酵素75%以下の相同性を有する蛋白質をナショナル・センター・フォー・バイオテクノロジー・インフォメーション（以下、NCBIと略記する）のジェンバンク（GenBank；以下、GBと略記する）データベースから、配列番号2に示すシュードモナス・アルギノサPA0株のパラヒドロキシ安息香酸水酸化酵素のアミノ酸配列を問い合わせ配列とするBLAST相同性解析法を用いて検索を行った。その結果、表1に示す12種類の蛋白質が得られた。それぞれの蛋白質の略号とシュードモナス・アルギノサPA0株のパラヒドロキシ安息香酸水酸化酵素との相同性%を表1に示した。

【表1】

表1

GBアクセッション番号	蛋白質略号	蛋白質が由来した菌株名	蛋白質の配列番号	シュードモナス・アルギノサPA0株のパラヒドロキシ安息香酸水酸化酵素との相同性%
YP_046111.1	HFM5	アシネトバクター・カルコアセティカス ADP1	6	62.2%
NP_773060.1	HFM77	ブラディリゾビウム・ジャポニカム USDA110	8	50.5%
NP_774478.1	HFM86	ブラディリゾビウム・ジャポニカム USDA110	10	63.7%
NP_421207.1	HFM122	カウロバクター・クレセントス CB15	12	60.7%
NP_600305.1	HFM145	コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13032	14	40.1%
NP_745674.1	HFM305	シュードモナス・プチダ KT2440	16	74.9%
NP_947126.1	HFM339	ロドシュードモナス・パルストリス CGA009	18	71.1%
NP_438035.1	HFM388	シノリゾビウム・メリロティ 1021	20	62.9%
ZP_00381280.1	HFM544	ブレビバクテリウム・リネンズ BL2	22	44.2%
ZP_00379253.1	HFM545	ブレビバクテリウム・リネンズ BL2	24	18.7%
YP_497706.1	HFM689	ノボスフィンゴビウム・アロマティカボランス DSM 12444	26	60.2%
YP_587618.1	HFM737	ラルストニア・メタリデュランス CH34	28	50.0%

【0062】

(2) 染色体DNAの単離精製

表1記載の12種類の蛋白質をコードするDNAをPCR法を用いてクローニングするために、各菌株の染色体DNAを下記のようにして調製または入手した。

【0063】

菌株アシネトバクター・カルコアセティカスADP1（ATCC番号：33305）はATCCから入手し、また菌株コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032（NBR番号：12168

10

20

30

40

50

）はN B R Cから入手した。これらの菌株は各機関から入手した情報に従って培養した。菌株ブラディリゾビウム・ジャポニカムUSDA110および菌株シノリゾビウム・メリロティ1021は財団法人かずさDNA研究所の柴田大輔博士より分与を受け、同博士から教授された方法に従って培養した。これら培養菌体から染色体DNAをディーエヌイージー・ティッシュ・キット（キアゲン社製（DNeasy tissue kit；Qiagen）を用いて単離精製した。菌株カウロバクター・クレセントスCB15の染色体DNA（ATCC番号：19089D）、菌株シュールドモナス・プチダKT2440の染色体DNA（ATCC番号：47054D）、菌株ロドシュールドモナス・パルストリスCGA009の染色体DNA（ATCC番号：BAA-98D）、菌株ブレヴィバクテリウム・リネンズBL2の染色体DNA（ATCC番号：9175D）、菌株ノボスフィンゴビウム・アロマティカボランスDSM 12444の染色体DNA（ATCC番号：700278D）、および菌株ラルストニア・メタリデュランスCH34の染色体DNA（ATCC番号：43123D）はATCCから入手した。

10

【0064】

（3）PCRプライマーの設計と調製

表2に示す12種類の遺伝子について、NCBIのGenBankデータベースより塩基配列データ（配列番号5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25および27）をインターネット経由で取得した。各塩基配列データのGBアクセッション番号は表2に示した。これらの塩基配列をもとに各遺伝子のDNAをPCR法を用いてクローニングするためのPCRプライマーを設計し、合成した。各PCRプライマーの塩基配列は表2に示した。

20

【0065】

（4）PCR法による各酵素をコードするDNAの増幅

ロシュ・ダイアグノスティクス社から購入したエキスパンド・ハイ・フィデリティ・PCRシステム（Expand High Fidelity PCR System）およびロシュ・ダイアグノスティクス社から購入したジー・シー・リッチ・PCRシステム（GC Rich PCR System）を用いて、上記2で得た染色体DNAを鋳型にし、表2記載のDNAプライマーを用いて、添付の説明書に従って表2に示した遺伝子のDNAを増幅させた。なお、ジー・シー・リッチ・PCRシステムを用いたPCR反応はデメチルスルホオキシドと7-deasa-dGTPの存在下で実施した。

【表 2】

表 2

遺伝子名	遺伝子配列 (G B アクセス番号)	P C Rプライマー配列 (F : フォワードプライマーと R : リバースプライマー)
HFM5 遺伝子	NC_005966.1	F : 配列番号 3 5 R : 配列番号 3 6
HFM77 遺伝子	NC_004463.1	F : 配列番号 3 7 R : 配列番号 3 8
HFM86 遺伝子	NC_004463.1	F : 配列番号 3 9 R : 配列番号 4 0
HFM122 遺伝子	NC_002692.2	F : 配列番号 4 1 R : 配列番号 4 2
HFM145 遺伝子	NC_003450.3	F : 配列番号 4 3 R : 配列番号 4 4
HFM305 遺伝子	NC_002947.3	F : 配列番号 4 5 R : 配列番号 4 6
HFM339 遺伝子	NC_005296.1	F : 配列番号 4 7 R : 配列番号 4 8
HFM388 遺伝子	NC_003078.1	F : 配列番号 4 9 R : 配列番号 5 0
HFM544 遺伝子	NZ_AAGP01000002.1	F : 配列番号 5 1 R : 配列番号 5 2
HFM545 遺伝子	NZ_AAGP01000002.1	F : 配列番号 5 3 R : 配列番号 5 4
HFM689 遺伝子	NC_07794.1	F : 配列番号 5 5 R : 配列番号 5 6
HFM737 遺伝子	NC_07974.1	F : 配列番号 5 7 R : 配列番号 5 8

【 0 0 6 6 】

(5) 遺伝子のクローニング

上記 4 で得られた HFM5 遺伝子の D N A、HFM77 遺伝子の D N A、HFM86 遺伝子の D N A、HFM122 遺伝子の D N A、HFM145 遺伝子の D N A、HFM305 遺伝子の D N A、HFM339 遺伝子の D N A、HFM388 遺伝子の D N A、HFM544 遺伝子の D N A、HFM545 遺伝子の D N A、HFM689 遺伝子の D N A および HFM737 遺伝子の D N A をそれぞれクローンテック社から購入した B D ・インフュージョン・P C R ・クローニング・キット (BD In-Fusion PCR Cloning Kit) を用いて、大腸菌 T7 プロモーターを利用した大腸菌用発現ベクターであるプラスミド pROX1 (ロシュ・アプライド・サイエンス社から入手した ; 塩基配列は配列番号 5 9 に示した) の制限酵素部位 Nco I と制限酵素部位 Sma I の間にクローニングし、それぞれの遺伝子を発現するプラスミド pROX_HFM5、pROX_HFM77、pROX_HFM86、pROX_HFM122、pROX_HFM145、pROX_HFM305、pROX_HFM339、pROX_HFM388、pROX_HFM544、pROX_HFM545、pROX_HFM689 および pROX_HFM737 を得た。なお、これら発現プラスミドは、各野生型酵素の C 末端に Gly-Gly-Gly-Ser-His-His-His-His-His (配列番号 8 2) の 1 0 アミノ酸のペプチドが付加された酵素蛋白質が発現する構造を有する。

【 0 0 6 7 】

これらプラスミドに組み込まれた D N A の塩基配列は、財団法人かずさ D N A 研究所の柴

10

20

30

40

50

田大輔博士に依頼して、ジデオキシヌクレオチド酵素法 (dideoxychain termination法) [Sanger, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 74, p.5463, (1977)] に
より決定され、それぞれのプラスミドが目的の遺伝子を含むことを確認した。

【0068】

(6) 形質転換株の造成と培養

上記5で述べたプラスミドpROX_HFM5、pROX_HFM77、pROX_HFM86、pROX_HFM122、pROX_HFM145、pROX_HFM305、pROX_HFM339、pROX_HFM388、pROX_HFM544、pROX_HFM545、pROX_HFM689およびpROX_HFM737をそれぞれ大腸菌K-12 BL21(DE3)株にカルシウムイオンを用いる形質転換法を用いて導入することにより、形質転換株BL21/ pROX_HFM5、BL21/ pROX_HFM77、BL21/ pROX_HFM86、BL21/ pROX_HFM122、BL21/ pROX_HFM145、BL21/ pROX_HFM305、BL21/pROX_HFM339、BL21/ pROX_HFM388、BL21/ pROX_HFM544、BL21/pROX_HFM545、BL21/ pROX_HFM689、およびBL21/ pROX_HFM737を造成した。なお、BL21(DE3)株は、大学共同利用機関法人情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所 ナショナル・バイオ・リソース・プロジェクトより菌株番号ME9026として入手した。

【0069】

(7) 上記形質転換株を用いた没食子酸の生産

上記12種類の形質転換体を5mlのLB培地で一晩培養した。プラスミドを維持するためにアンピシリンを最終濃度100ppmになるように加えた。新しいLB培地に1/100容量接種し、25℃で培養し対数増殖期にIPTG (isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside) を終濃度1mMになるように添加し、3時間タンパク誘導を行った。タンパク誘導後、大腸菌を遠心によって集菌した。上清を捨て、500μlのHEPES緩衝液(50mM HEPES-NaOH (pH7.5)、10%グリセロール)に懸濁した。大腸菌懸濁液を超音波破碎機によって、細胞破碎を行った。大腸菌懸濁液は遠心分離(4℃、10分、20000×g)を行い、上清と沈殿物に分離し、上清を粗酵素液とした。粗酵素液のタンパク濃度をブラッドフォード法に基づいたバイオラッド(Bio-Rad)プロテイン・アッセイ(Bio-Rad Laboratories, CA, USA)を用いて計測し、1mg/mlになるようにHEPES緩衝液で希釈した。

【0070】

没食子酸合成反応は0.5mMの基質(プロトカテキ酸またはパラヒドロキシ安息香酸)、0.01mM FAD、0.01mM FMN、2.5mM NADH、25mM NADPHを含むHEPES緩衝液中で100μlの反応系で行った。プロトカテキ酸を基質にした場合、粗酵素68μgを反応液に加えて反応を開始した。酵素反応液は30℃で反応を行い0時間および1時間後に1mlの酢酸エチルにて反応を停止した。また、パラヒドロキシ安息香酸を基質にした場合、粗酵素10μgを反応液に加えて反応を開始した。酵素反応液は30℃で反応を行い、0分および30分後に1mlの酢酸エチルにて反応を停止した。さらに150μlのHEPES緩衝液と2N HCl 1.5μlを加えて、5分間激しく混和し、遠心分離(室温、5分、20000×g)を行った。二層に分離した反応液・酢酸エチル混和物の上層(酢酸エチル層)を800μl回収し、新しい1.5mlチューブに移した。

【0071】

真空遠心乾燥機で乾燥後、10μlアセトニトリルを加え、5分間激しく混和し、さらに190μlの水で希釈し、孔径0.2μmのフィルター(Millex-LG)で濾過し、バイアル瓶に注入した。バイアル瓶はLC-TOF型質量分析計(Waters社、LCT Premier XE)にセットし、LC-TOF型質量分析計による解析を行った。没食子酸はLC-TOF型質量分析計を用いて検出した。標品の没食子酸と比較して、高速液体クロマトグラフィーの保持時間と質量分析計からの質量値を合わせて生産された没食子酸を同定した。

【0072】

12種類のHFM酵素群のうち、10種類(HFM5、HFM86、HFM145、HFM305、HFM339、HFM388、HFM544、HFM545、HFM689およびHFM737)はプロトカテキ酸を基質にした場合、没食子酸を合成した。それぞれの粗酵素タンパク1mg当たりの1時間当たりの没食子酸合成はHF

M5 (151 μ M/時間/mg 粗酵素タンパク)、HFM86 (30 μ M/時間/mg 粗酵素タンパク)、HFM145 (249 μ M/時間/mg 粗酵素タンパク)、HFM305 (359 μ M/時間/mg 粗酵素タンパク)、HFM339 (20 μ M/時間/mg 粗酵素タンパク)、HFM388 (11 μ M/時間/mg 粗酵素タンパク)、HFM544 (35 μ M/時間/mg 粗酵素タンパク)、HFM545 (8 μ M/時間/mg 粗酵素タンパク)、HFM689 (350 μ M/時間/mg 粗酵素タンパク) およびHFM737 (41 μ M/時間/mg 粗酵素タンパク)であった。HFM 145、HFM 305及びHFM689で特に没食子酸合成活性が強かった。

【0073】

実施例2. 単離した水酸化酵素の活性とPAO変異酵素の活性を以下のようにして比較した。

1. ポリシストロン型発現プラスミドの構築

10

上記HFM145酵素遺伝子、HFM305酵素遺伝子及びHFM689酵素遺伝子が大腸菌 JM109株、大腸菌 JM109(DE3)株や大腸菌 BL21(DE3)株で各遺伝子の転写・翻訳効率に依存しない効率よい発現を行うために、目的遺伝子の転写は疑似遺伝子に依存し、疑似遺伝子の翻訳効率を維持した状態で目的遺伝子も翻訳される発現系の構築を行った。より具体的にはT7プロモーター配列と疑似遺伝子及び目的遺伝子をHindIII部位とSphI部位を介してpUC19プラスミドDNA内に挿入するために、配列番号60～63で表される4本の合成DNAを合成した。これら合成DNAをpUC19(タカラバイオ(株)社製)のHindIII部位とSphI部位の間に挿入し、発現ベクターpUTCH19を構築した。

【0074】

2. PAO変異酵素の造成とベクターへの組み込み

20

シュドモナス・アルギノサPA0株のパラヒドロキシ安息香酸水酸化酵素遺伝子塩基配列データ(NC_002516)をNCBIのGenBankデータベースよりインターネット経由で取得した。この塩基配列をもとに各遺伝子のDNAをPCR法を用いてクローニングするための配列番号64で表されるフォワードPCRプライマーと配列番号65で表されるリバーズPCRプライマーを設計し、合成した。シュドモナス・アルギノサPA0株の染色体DNA(ATCC番号:47085D-5)をATCCから入手し、これを鋳型として、2種のPCRプライマーとPrimeSTAR酵素(タカラ・バイオ社製)を用いたPCRによりパラヒドロキシ安息香酸水酸化酵素遺伝子のDNAを増幅させた後、Taqポリメラーゼ(タカラ・バイオ社製)による3'末端にA残基を付与する処理を行った。ゲル電気泳動後により目的DNAを精製した後、pT7Blue-Tベクターに組み込むことにより、パラヒドロキシ安息香酸水酸化酵素蛋白質HFM300をコードするDNAを運ぶプラスミドpT7Blue_HFM300を造成した。pT7Blue_HFM300から制限酵素HindIIIと制限酵素XbaIにより各酵素蛋白質をコードするDNAを切り出し、発現ベクターpUTCH19に組み込むことにより、プラスミドpUTCH_HFM300を造成した。

30

【0075】

同様に、配列番号66で表されるフォワードPCRプライマーと配列番号67で表されるリバーズPCRプライマーを用いるPCR法により、酵素蛋白質HFM300の385番目のチロシンをフェニルアラニンに置換した変異酵素蛋白質HFM300Y385F(PAO変異酵素)をコードするDNAを増幅し、pT7Blue-Tベクターに組み込むことにより、蛋白質HFM300Y385FをコードするDNAを運ぶプラスミドpT7Blue_HFM300Y385Fを造成した。pT7Blue_HFM300Y385Fから制限酵素HindIIIと制限酵素XbaIにより各酵素蛋白質をコードするDNAを切り出し、発現ベクターpUTCH19に組み込むことにより、プラスミドpUTCH_HFM300Y385Fを造成した。

40

【0076】

3. 酵素蛋白質HFM145、酵素蛋白質HFM305および、酵素蛋白質HFM689を発現するプラスミドの構築

実施例1の結果から、酵素蛋白質HFM145、酵素蛋白質HFM305および酵素蛋白質HFM689を発現する形質転換株の培養抽出液を用いたときに、良好な没食子酸の生成が観察された。そこで、酵素蛋白質HFM145、酵素蛋白質HFM305および酵素蛋白質HFM689を効率よく発現するプラスミドの構築を行った。上記プラスミドpROX_HFM145、pROX_HFM305およびpROX_HFM689から生産される酵素蛋白質HFM145、酵素蛋白質HFM305および酵素蛋白質HFM689は、いず

50

れも C 末端に10アミノ酸のペプチド (Gly-Gly-Gly-Ser-His-His-His-His-His (配列番号 82)) が付加されている。これらペプチドを除去した酵素蛋白質を発現するプラスミドを構築するために、まず表 3 に示す P C R プライマーを設計し、合成した。

【表 3】

表 3

遺伝子名	P C R プライマー配列 (F : フォワードプライマーと R : リバースプライマー)
HFM145 遺伝子	F : 配列番号 68 R : 配列番号 69
HFM305 遺伝子	F : 配列番号 70 R : 配列番号 71
HFM689 遺伝子	F : 配列番号 72 R : 配列番号 73

10

【0077】

pROX_HFM145、pROX_HFM305、pROX_HFM689のプラスミド D N A を鋳型として、上表の PCR プライマーと PrimeSTAR 酵素 (タカラ・バイオ社製) を用いた P C R により目的 D N A を増幅させた後、Taq ポリメラーゼ (タカラ・バイオ社製) による 3' 末端に A 残基を付与する処理を行った。ゲル電気泳動後により目的 D N A を精製した後、pT7Blue-T ベクターに組み込むことにより、プラスミド pT7Blue_HFM145、プラスミド pT7Blue_HFM305、プラスミド pT7Blue_HFM689 を造成した。これらプラスミドから制限酵素 HindIII と制限酵素 XbaI または KpnI により各酵素蛋白質をコードする D N A を切り出し、発現ベクター pUTCH19 に組み込むことにより、プラスミド pUTCH_HFM145、pUTCH_HFM305、pUTCH_HFM689 を造成した。

20

【0078】

4. 変異酵素蛋白質 HFM145Y385F、変異酵素蛋白質 HFM305Y386F および変異酵素蛋白質 HFM689Y384 を発現するプラスミドの構築

これまでにプロトカテク酸から没食子酸を生成する活性を持つことが証明された酵素は、酵素蛋白質 HFM300 の 385 番目のチロシンをフェニールアラニンに置換した変異酵素蛋白質 HFM300Y385F のみであった。そこで、酵素蛋白質 HFM145 の 385 番目のチロシンをフェニールアラニンに置換した変異酵素蛋白質 HFM145Y385F、酵素蛋白質 HFM305 の 386 番目のチロシンをフェニールアラニンに置換した変異酵素蛋白質 HFM305Y386F、酵素蛋白質 HFM689 の 384 番目のチロシンをフェニールアラニンに置換した変異酵素蛋白質 HFM689Y384F を発現するプラスミドを

30

上記 3 に述べた方法と同様の方法により構築した。

【表 4】

表 4

遺伝子名	P C R プライマー配列 (F : フォワードプライマーと R : リバースプライマー)
HFM145 遺伝子	F : 配列番号 74 R : 配列番号 75
HFM305 遺伝子	F : 配列番号 76 R : 配列番号 77
HFM689 遺伝子	F : 配列番号 78 R : 配列番号 79

40

【0079】

まず表 4 に示す P C R プライマーを設計し、合成した。pROX_HFM145、pROX_HFM305、pROX_HFM689 のプラスミド D N A を鋳型として、表 4 の PCR プライマーと PrimeSTAR 酵素 (タカラ・バイオ社製) を用いた P C R 法により目的 D N A を増幅させた後、Taq ポリメラーゼ

50

(タカラ・バイオ社製)による3'末端にA残基を付与する処理を行った。ゲル電気泳動後により目的DNAを精製した後、pT7Blue-Tベクターに組み込むことにより、プラスミドpT7Blue_HFM145Y385F、プラスミドpT7Blue_HFM305Y386F、プラスミドpT7Blue_HFM689Y384Fを造成した。これらプラスミドから制限酵素HindIIIと制限酵素XabIまたはKpnIにより各酵素蛋白質をコードするDNAを切り出し、発現ベクターpUTCH19に組み込むことにより、プラスミドpUTCH_HFM145Y385F、pUTCH_HFM305Y386F、pUTCH_HFM689Y384Fを造成した。

【0080】

5. 蛋白質HFM300、HFM300Y385F、HFM145、HFM145Y385F、HFM305、HFM305Y386F、HFM689、およびHFM689Y384Fの大腸菌による生産

プラスミドpUTCH_HFM300、pUTCH_HFM300Y385F、pUTCH_HFM145、pUTCH_HFM145Y385F、pUTCH_HFM305、pUTCH_HFM305Y386F、pUTCH_HFM689およびpUTCH_HFM689Y384Fをそれぞれ大腸菌JM109に形質転換法により導入し、組換え大腸菌JM109/pUTCH_HFM300、JM109/pUTCH_HFM300Y385F、JM109/pUTCH_HFM145、JM109/pUTCH_HFM145Y385F、JM109/pUTCH_HFM305、JM109/pUTCH_HFM305Y386F、JM109/pUTCH_HFM689FおよびJM109/pUTCH_HFM689Y384Fを造成した。これら形質転換体を、lacプロモーター誘導発現用培地であるオーバーナイト・エクスプレス・インスタントTB (Overnight Express Instant TB; Novagen社製; 以下、OEI-TB培地と略す)を用いて、37℃で14時間培養した。集菌後、HEPES-グリシン緩衝液 0.5 mlに懸濁した。この懸濁液に対して超音波破碎処理を加え、遠心した後、上清を回収して粗酵素液とした。続いて、粗酵素液の蛋白質濃度をブラッドフォード法により計測し、1 mg/mlに調製した。

【0081】

6. 没食子酸合成酵素活性の測定

上記5で調製した粗酵素液の没食子酸合成酵素活性を次のようにして測定した。酵素反応は、プロトカテク酸(基質) 500 μM、FAD 10 μM、FMN 10 μM、NADH 2.5 mM、NADP 2.5 mM、粗酵素液 68 μgを含む100 μlの反応液で30℃で1時間行った。反応後、LC-TOF型質量分析計(Waters社、LCT Premier XE)を用いて、生成した没食子酸の量を測定した。その結果、組換え大腸菌JM109/pUTCH_HFM300、JM109/pUTCH_HFM300Y385F、JM109/pUTCH_HFM145、JM109/pUTCH_HFM145Y385F、JM109/pUTCH_HFM305、JM109/pUTCH_HFM305Y386F、JM109/pUTCH_HFM689FおよびJM109/pUTCH_HFM689Y384Fにおいて、それぞれ1 mg蛋白質あたり、133 μM、133 μM、172 μM、865 μM、1466 μM、408 μM、500 μM、428 μMの没食子酸が検出された。この活性測定結果より、各没食子酸合成酵素の活性比は下表のとおりである。

【表5】

表5

	HFM300 に対する酵素活性(倍率)	HFM300Y385F に対する酵素活性(倍率)
HFM145	1.3	1.3
HFM145Y385F	6.5	6.5
HFM305	11.0	11.0
HFM305Y386F	3.1	3.1
HFM689	3.7	3.7
HFM689Y384F	3.2	3.2

【0082】

発現ベクターpUTCH19においては、該ベクターに組み込まれた遺伝子は同じ発現効率で蛋白質が生産されるように設計されているが、そのことを確認するために、上記粗酵素液内の没食子酸合成酵素蛋白質の量を下記のようにして測定した。上記で1 mg/mlに調製した粗酵素タンパク液 10 μL (10 μg)にβ-メルカプトエタノール(99.5%を0.25 μl、10%ドデシル硫酸ナトリウム溶液を1.25 μl、染色液1.25 μl加え

て、5分間煮沸処理を行った。冷却した泳動用サンプルをポリアクリルアミドゲル（ATTO e-PAGEL E-T1020L）のウェルにアプライし、20 mAで80分間泳動した。ゲルをクマシブリリアントブルー溶液（ATTO EzStainAqua）を用いてタンパク染色を行った。蒸留水で十分に脱色し、スキャナーを用いて画像を電子的に取り込んだ。ベクターコントロールと比較して、新しく発現したタンパクの中にHFM酵素タンパクのアミノ酸配列から予想される分子量（約44 kD）のシグナルが見られた。電子的に取り込んだ画像を画像処理ソフトウェアNIH ImageJ (<http://www.bioarts.co.jp/~ijjp/ij/>)で解析したところ、各HFM酵素タンパクの発現量はサンプル間で違いは観察されなかった。

【0083】

実施例3. パラヒドロキシ安息香酸を原料とする大腸菌による没食子酸の生産を下記のようにして行った。

組換え大腸菌JM109/pUTCH_HFM300、JM109/pUTCH_HFM300Y385FおよびJM109/pUTCH_HFM305を、OEI-TB培地を用いて、25℃で一晩培養した後、集菌し、培地を捨てた。0.5 mMパラヒドロキシ安息香酸と1 mM IPTGを含む新しいLB培地（pH 5.95）3 mlを加え、25℃で20時間培養した。培養液を0.1 ml取り、酢酸エチル1 mlを加えた後、5分間攪拌した。HEPES-グリシン緩衝液0.15 mlと5 μlの2 N HClを添加した後、5分間遠心分離を行った。上層800 μlを採取し、乾燥させた。乾燥物をアセトニトリル10 μlに溶解した、水190 μlを加えた後、LC-TOF型質量分析計（Waters社、LCT Premier XE）を用いて、生成した没食子酸の量を測定した。その結果は、組換え大腸菌JM109/pUTCH_HFM300、JM109/pUTCH_HFM300Y385FおよびJM109/pUTCH_HFM305の没食子酸生成量はそれぞれ4 μM、2.5 μM、42 μMであった。したがって、JM109/pUTCH_HFM305の没食子酸生産性はJM109/pUTCH_HFM300の9.5倍、JM109/pUTCH_HFM300Y385Fの17.1倍であった。

【0084】

実施例4. 大腸菌によるテレフタル酸からの没食子酸の生産を下記のようにして行った。

1. テレフタル酸ジオキシゲナーゼ、テレフタル酸ジオキシゲナーゼ・レダクターゼ、テレフタル酸1,2-ジヒドロジオール ジヒドロゲナーゼおよびテレフタル酸トランスポーターの蛋白質をコードするDNAクローニング

ロドコッカス属（*Rhodococcus* sp.）RHA1株のテレフタル酸ジオキシゲナーゼ、テレフタル酸ジオキシゲナーゼ・レダクターゼ、テレフタル酸1,2-ジヒドロジオール ジヒドロゲナーゼ酵素遺伝子の塩基配列データ（NC_008268、NC_008269、NC_008270、NC_008271）をNCBIのGenBankデータベースよりインターネット経由で取得した。この塩基配列をもとに各遺伝子のDNAをPCR法を用いてクローニングするための配列番号80で表されるフォワードPCRプライマーおよび配列番号81で表されるリバーズPCRプライマーを設計し、合成した。*Rhodococcus* sp. RHA1株の染色体DNAを鋳型として、2種のPCRプライマーとPrimeSTAR酵素（タカラ・バイオ社製）を用いたPCRによりテレフタル酸ジオキシゲナーゼ、テレフタル酸ジオキシゲナーゼ・レダクターゼ、テレフタル酸1,2-ジヒドロジオール ジヒドロゲナーゼ酵素遺伝子のDNAを増幅させた後、Taq ポリメラーゼ（タカラ・バイオ社製）による3'末端にA残基を付与する処理を行った。ゲル電気泳動後により目的DNAを精製した後、pT7Blue-T ベクターに組み込むことにより、テレフタル酸ジオキシゲナーゼ、テレフタル酸ジオキシゲナーゼ・レダクターゼ、テレフタル酸1,2-ジヒドロジオール ジヒドロゲナーゼをコードするDNAを運ぶプラスミドpT7Blue_TPACB1を造成した。pT7Blue_TPACB1から制限酵素HindIIIと制限酵素XbaIにより各酵素蛋白質をコードするDNAを切り出し、発現ベクターpUTCH19に組み込むことにより、プラスミドpUTCH_TPACB1を造成した。

なお、*Rhodococcus* sp. RHA1株は長岡科学技術大学の福田雅夫博士より分与を受け、同博士から教授された方法に従って培養した。培養菌体から染色体DNAをディーエヌイージー・ティッシュ・キット（キアゲン社製（DNeasy tissue kit; Qiagen）を用いて単離精製した。

【0085】

2. テレフタル酸からの没食子酸の合成

pUTCH_TPACB1とpRTCH_HFM145_Y385F またはpUTCH_TPACB1とpRTCH_HFM305を用いて大腸菌JM109(DE3)を形質転換し、組換え大腸菌JM109(DE3)/(pUTCH_TPACB1, pRTCH_HFM145_Y385F)、およびJM109 (DE3)/(pUTCH_TPACB1, pRTCH_HFM305)を得た。

得られた組換え大腸菌JM109(DE3)/(pUTCH_TPACB1, pRTCH_HFM145_Y385F)、JM109 (DE3)/(pUTCH_TPACB1, pRTCH_HFM305)を5 mlのOEI-TB培地を用いて37℃で14時間培養した。集菌後、LB培地（カナマイシン50 ppm、アンピシリン100 ppm、IPTG 1 mM、pH 5.95）3 mlに懸濁し、25℃で4時間培養した。菌懸濁液500 µlを取り、1.5 mlチューブに移した。テレフタル酸を終濃度0.5 mMになるように添加した。0.5、24時間に菌懸濁液から100 µlとり、1 mlの酢酸エチル、150 µlのHEPES緩衝液 5 µlの2N HClを加え、激しく5分間懸濁し、遠心にかけた。二層に分かれた上層（酢酸エチル層）を800 µlとり、新しい1.5 mMチューブに移し、遠心乾燥機にかけた。乾固したサンプルを10 µlのアセトニトリルで激しく懸濁し、190 µlの水で希釈した。孔径0.2 µmのフィルターで濾過し、LC-TOF型質量分析計（Waters社、LCT Premier XE）で解析した。

【0086】

その結果、OEI-TB培地中の培養時間が4時間のときは、組換え大腸菌JM109 (DE3)/(pUTCH_TPACB1, pRTCH_HFM145_Y385F)とJM109 (DE3)/(pUTCH_TPACB1, pRTCH_HFM305)はそれぞれ2 µMと39 µMの没食子酸の生産が観察された。また、OEI-TB培地中の培養時間が20時間のときは、組換え大腸菌JM109 (DE3)/(pUTCH_TPACB1, pRTCH_HFM145_Y385F)とJM109 (DE3)/(pUTCH_TPACB1, pRTCH_HFM305)はそれぞれ66 µMと9 µMの没食子酸の生産が観察された。

【配列表】

0005140848000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 1 2 R	1/38 (2006.01)	C 1 2 R 1:01
C 1 2 R	1/13 (2006.01)	C 1 2 P 7/42
		C 1 2 R 1:15
		C 1 2 P 7/42
		C 1 2 R 1:38
		C 1 2 P 7/42
		C 1 2 R 1:13

(72)発明者 西 達也
東京都大田区東嶺町 3 9 - 1 5

審査官 藤井 美穂

(56)参考文献 米国特許第 6 4 7 2 1 9 0 (U S, B 1)
特開平 9 - 1 7 3 0 7 4 (J P, A)
特表 2 0 0 5 - 5 1 6 5 8 5 (J P, A)
The Journal of Biological Chemistry, 1 9 9 1 年, Vol.266, No.26, pp.17341-17349
Definition: 2-polyprenyl-6-methoxyphenol hydroxylase and related FAD-dependent oxidoreductases., 31-OCT-2006 uploaded, Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accessin No.Q8NRH2, 2 0 1 2 年 9 月 2 0 日, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/q8nrh2>>
Definition: 4-hydroxybenzoate hydroxylase., 31-OCT-2006 uploaded, Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accessin No.Q88H28, 2 0 1 2 年 9 月 2 0 日, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/q88h28>>
Bio. Ind., 2 0 1 1 年, Vol.28, No.11, pp.44-49

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)
C 1 2 P 1 / 0 0 - 4 1 / 0 0
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
C 1 2 N 9 / 0 0 - 9 / 9 9
CAPLUS / BIOSIS / MEDLINE / WPIDS (STN)
UniProt / GeneSeq