(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2005-534328
(P2005-534328A)
(43)公表日　平成17年11月17日(2005.11.17)

| (51)Int.Cl.[7] | FI | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|
| C12P 13/22 | C12P 13/22 | ZNAD | 4B024 |
| C12N 15/09 | C12N 15/00 | A | 4B064 |
| //(C12P 13/22 | C12P 13/22 | D | |
| C12R 1:19 ) | C12R 1:19 | | |

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 21 頁）

(21)出願番号　特願2004-526841 (P2004-526841)
(86)(22)出願日　平成15年7月31日 (2003.7.31)
(85)翻訳文提出日　平成17年4月4日 (2005.4.4)
(86)国際出願番号　PCT/EP2003/008507
(87)国際公開番号　WO2004/015094
(87)国際公開日　平成16年2月19日 (2004.2.19)
(31)優先権主張番号　02102101.9
(32)優先日　平成14年8月6日 (2002.8.6)
(33)優先権主張国　欧州特許庁 (EP)
(31)優先権主張番号　03100730.5
(32)優先日　平成15年3月21日 (2003.3.21)
(33)優先権主張国　欧州特許庁 (EP)

(71)出願人　503220392
ディーエスエム　アイピー　アセッツ　ビー．ブイ．
オランダ国，　６４１１　ティーイー　ヘーレン，　ヘット　オーバールーン　１
(71)出願人　500538704
ディーエスエム　ビオテック　ゲーエムベーハー
ドイツ国，５２４２８　ジューリッヒ，カール－ハインツ－ベッカルツ　ストラーセ　１３
(74)代理人　100085545
弁理士　松井　光夫

最終頁に続く

(54)【発明の名称】微生物の好気性発酵によるＬ－３，４－ジヒドロキシフェニルアラニンの製造法

(57)【要約】

本発明は、Ｌ－３，４－ジヒドロキシフェニルアラニンが、Ｌ－チロシン－３－ヒドロキシ－モノ－オキシゲナーゼ活性及び少なくとも代謝経路：グリコリシス、ペントースホスフェート経路、芳香族アミノ酸経路、又はそれらの派生経路を有する組み換え微生物の好気性発酵により、発酵培地中で製造されるところのＬ－３，４－ジヒドロキシフェニルアラニンの製造方法であって、（ｉ）Ｌ－３，４－ジヒドロキシフェニルアラニンが発酵培地において製造されるところの成長相及び製造相、及び（ｉｉ）ダウンストリームプロセッシング相を含む方法に関し、該方法においてＬ－３，４－ジヒドロキシフェニルアラニンが炭素源から製造され、製造相及び／又はダウンストリームプロセッシング相の少なくとも一部の間、ｐＨが１～７の範囲である。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
Ｌ－３，４－ジヒドロキシフェニルアラニンが、Ｌ－チロシン－３－ヒドロキシ－モノ－オキシゲナーゼ活性及び少なくとも代謝経路：グリコリシス、ペントースホスフェート経路、芳香族アミノ酸経路、又はそれらの派生経路を有する組み換え微生物の好気性発酵により、発酵培地中で製造されるところのＬ－３，４－ジヒドロキシフェニルアラニンの製造方法であって、
（ｉ）Ｌ－３，４－ジヒドロキシフェニルアラニンが発酵培地において製造されるところの成長相及び製造相、及び
（ｉｉ）ダウンストリームプロセッシング相
を含む方法において、
Ｌ－３，４－ジヒドロキシフェニルアラニンが炭素源から製造されること、及び製造相及び／又はダウンストリームプロセッシング相の少なくとも一部の間、ｐＨが１～７の範囲であることを特徴とする方法。
【請求項２】
製造されたＬ－３，４－ジヒドロキシフェニルアラニンが、ダウンストリームプロセッシング相において発酵培地から抽出され、そして再抽出混合物中へと再抽出されることを特徴とする請求項１に記載の方法。
【請求項３】
発酵の全製造相の間、及び／又は全ダウンストリームプロセッシング相の間、Ｌ－３，４－ジヒドロキシフェニルアラニンを含む発酵培地のｐＨ及び／又はＬ－３，４－ジヒドロキシフェニルアラニンを含む再抽出混合物のｐＨが、１～７であることを特徴とする、請求項１又は２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４】
Ｌ－３，４－ジヒドロキシフェニルアラニンが、疎水性相互作用できる表面を有する吸着樹脂により、及び次に、結合されたＬ－３，４－ジヒドロキシフェニルアラニンの該樹脂からの再抽出混合物を用いる溶出により発酵培地から回収されることを特徴とする、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５】
Ｌ－３，４－ジヒドロキシフェニルアラニンが、インシチュー製造物回収により発酵培地から抽出されることを特徴とする、請求項１～４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６】
インシチュー製造物回収が、Ｌ－３，４－ジヒドロキシフェニルアラニン及び微生物の細胞を含む発酵培地をフィルター上にポンプ輸送して、発酵培地から細胞を分離する工程、Ｌ－３，４－ジヒドロキシフェニルアラニンを反応抽出により発酵培地から抽出し、Ｌ－３，４－ジヒドロキシフェニルアラニンを再抽出により再抽出混合物中に移す工程、及び細胞及び残った発酵培地を発酵にリサイクルさせる工程を含むことを特徴とする、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
組み換え微生物が、４－ヒドロキシフェニルアセテート３－ヒドロキシラーゼを発現する、好ましくは過剰発現することを特徴とする、請求項１～６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８】
組み換え微生物が、$FADH_2$－ＮＡＤ－オキシドリダクターゼをコードする遺伝子を発現する、好ましくは過剰発現することを特徴とする、請求項１～７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９】
炭素源がグルコースであることを特徴とする、請求項１～８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０】

微生物がEscherichia coli W3110／pACYCtac aro $F^{FBR}$ tyrA／ｐJF119EHaro $F^{FBR}$ tyrAであることを特徴とする、請求項１～９のいずれか１項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、Ｌ－３，４－ジヒドロキシフェニルアラニンが、Ｌ－チロシン－３－ヒドロキシ－モノーオキシゲナーゼ活性及び少なくとも代謝経路：グリコリシス、ペントースホスフェート経路、芳香族アミノ酸経路、又はそれらの誘導された経路を有する組み換え微生物の好気性発酵により、発酵培地中で製造されるＬ－３，４－ジヒドロキシフェニルアラニンの製造法において、該方法が（ｉ）Ｌ－３，４－ジヒドロキシフェニルアラニンが発酵培地において製造されるところの成長相及び製造相、及び（ｉｉ）ダウンストリームプロセッシング相を含む方法に関する。

【０００２】

Ｌ－３，４－ジヒドロキシフェニルアラニンは、Ｌ－ドーパとしてもまた知られ、とりわけパーキンソン病の治療薬において使用される。

【背景技術】

【０００３】

微生物の好気性発酵によるＬ－ドーパのそのような製造法は、リー（Lee）及びクサン（Xun）によりBiotechn. Lett.第２０巻、４７９～４８２ページにおいて開示される（該方法は、米国特許出願公開第５，８３７，５０４号においてもまた記載される）。該方法において、静かな振動下、Ｌ－チロシンとともに、４－ヒドロキシフェニルアセテート３－ヒドロキシラーゼ及び$FADH_2$－ＮＡＤオキシドレダクターゼをコードするhpaBC遺伝子を構成的に発現する組み換えE. coli DH1(pAJ22l)株の細胞をインキュベーションすることにより前駆体Ｌ－チロシンからＬ－ドーパが製造される。この方法の欠点は、これらの発酵において使用される水性溶液において、Ｌ－ドーパは非常に安定というわけではなく、容易に酸化されて、黒色又は茶色の重合化生成物を形成することである。引用された論文、４８０ページにおける、最初の完全な段落の最後における右列に従うと、そのような酸化反応はグリセロールの存在によりのみ避けられることができる。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【０００４】

安定なＬ－ドーパの発酵製造法を提供することが本発明の目的である。

【課題を解決するための手段】

【０００５】

この目的は、（請求項１のプレアンブルにおいて述べられた）Ｌ－３，４－ジヒドロキシフェニルアラニンの製造方法を提供することにより達成され、該方法においてＬ－３，４－ジヒドロキシフェニルアラニンは、炭素源から製造され、かつ製造相及び／又はダウンストリームプロセッシング相の少なくとも一部の間、ｐＨが１～７の範囲である。

【０００６】

驚いたことに、本発明の方法により、安定なＬ－ドーパが炭素源から工業的に魅力的な様式で製造され得ることが見出された。

【０００７】

本発明の方法は、実用的及び経済的理由の両方からＬ－ドーパの製造にとって魅力的な方法であり、理由は例えば

１．安定なＬ－ドーパが、炭素源としてのグルコースからグリセロールのない状態において製造される、

２．リー等の方法において使用されていた、高価なＬ－チロシンの代わりに、安価で容易に入手可能な炭素源、例えばグルコースが使用され得る

ことである。

【０００８】

日本国特許出願（公開番号：特開昭４９‐１００２９０、１９７４年９月２１日）において、野生型Pseudomonas細胞の発酵によりグルコース源からＬ－ドーパが製造され得ることが示されているが、該参考文献の教示は明らかに、富栄養培地（rich medium）（Luria-Bertani培地）における発酵の間に還元剤を添加することにより、及びキニン酸又はシキミン酸を同時添加することによりＬ－ドーパの製造を増加させることに向けられている。Ｌ－ドーパを（自動）酸化に対して安定化させるという問題は述べられていない。本発明に従う方法においては、還元剤の添加は必要とされない。

【０００９】

好ましくは、本発明に従う方法のダウンストリームプロセッシング相において、製造されたＬ－３，４－ジヒドロキシフェニルアラニンは発酵培地から抽出され、そして再抽出混合物へと再抽出される。

【００１０】

本発明の実施態様において発酵培地のｐＨは、発酵の少なくとも一部の間において、１～７、好ましくは４～７、より好ましくは５～７、特に５．５～６．８、最も特に６～６．５の間に保たれる。発酵は典型的に、成長相、及び製造相を含む。発酵の「成長相」は、発酵培地を含む微生物のバイオマス濃度が増加する相である。バイオマス濃度は、発酵ブロス、即ち微生物の細胞を含む発酵培地の６２０ｎｍにおける光学密度（$OD_{620nm}$）の測定により決定され得る。発酵の「製造相」は、製造物、この場合Ｌ－ドーパ、が製造される相である。成長相及び製造相は交互に起こり得るが、実際には、成長相及び製造相は重なる。好ましくは、本発明のこの実施態様においては、発酵培地のｐＨは、発酵の全製造相の少なくとも５０％（時間で）、より好ましくは少なくとも６５％、さらにより好ましくは８０％、特に９０％の間、１～７、好ましくは４～７、より好ましくは５～７、特に５．５～６．８、最も特に６～６．５に保たれる。

【００１１】

本発明の別の実施態様において、ダウンストリームプロセッシング相において使用される再抽出混合物のｐＨは、ダウンストリームプロセッシング相の少なくとも５０％（時間で）、より好ましくは少なくとも６５％、さらにより好ましくは８０％、特に少なくとも９０％の間、最も特に、全ダウンストリームプロセッシング相の間中、１～７、好ましくは４～７、より好ましくは５～７、特に５．５～６．８、最も特に６～６．５に保たれる。

【００１２】

Ｌ－３，４－ジヒドロキシ－フェニルアラニンを含む発酵培地のｐＨ及び／又はＬ－３，４－ジヒドロキシ－フェニルアラニンを含む再抽出混合物のｐＨは、発酵の全製造相の間、及び全ダウンストリームプロセッシング相の間、１～７の範囲であることが最も好ましい。

【００１３】

発酵培地からのＬ－ドーパの抽出は、標準的な精製テクニックを使用して、例えばイオン交換樹脂、クロマトグラフィー法、吸着、濾過、蒸発、逆浸透、電気透析等による発酵培地からのＬ－ドーパの分離により行われ得る。発酵培地からＬ－ドーパを回収する非常に良い方法は、Ｌ－ドーパが結合できる吸着樹脂を使用すること、及び、続いて、結合されたＬ－ドーパを樹脂から適する再抽出混合物、例えばメタノール／ＨＣｌ（ｐＨ＝２）で樹脂から分離することによる。Ｌ－ドーパを結合することのできる樹脂の例は、疎水性相互作用表面を有する樹脂、例えば吸着樹脂ＸＡＤ－４、ＸＡＤ－７、ＸＡＤ－１６、ＸＡＤ－１１８０、及びＸＡＤ－２０１０である。これらのＸＡＤ－樹脂は、例えばシグマ（Sigma）社から市販入手可能である。好ましくはＸＡＤ－１６及びＸＡＤ－１０８０がＬ－ドーパの結合の為に使用される。

【００１４】

発酵培地からのＬ－ドーパの抽出は、発酵が停止された後行われ得るが、好ましくはＬ－ドーパは発酵の製造相の間に、いわゆるインシチュー製造物回収テクニックにより抽出される。Ｌ－ドーパの抽出のためにインシチュー製造物回収テクニックを使用することは、発酵において可能性のある製造物阻害を防止することが可能であるという利点を有する。

インシチュー製造物回収において、製造物（本発明の場合Ｌ－ドーパ）及び微生物の細胞を含む発酵培地は、発酵の製造相の少なくとも一部の間、好ましくは発酵の全製造相の間中、１以上の分離デバイスにポンプ輸送され、そうすることにより製造物を発酵培地及び細胞から分離する。細胞及び発酵培地は発酵における使用の為にリサイクルされる。典型的に、そのようなインシチュー製造物回収において、製造物及び微生物の細胞を含む発酵培地は、最初にフィルターの上にポンプ輸送され、残った発酵培地から製造物が抽出される前に、細胞を発酵培地から分離する。細胞及び発酵培地は発酵における使用の為にリサイクルされる。

【００１５】

従って、本発明に従う方法のこの実施態様において、中間の精製工程は必要とされない。その利点は、例えば、生成物のより少ない損失、及び従ってより高い収率があること；必要とされるユニット操作が少なく、従って該方法が経済的により魅力的であること等である。

【００１６】

好ましくは、本発明に従う方法において、Ｌ－ドーパを含む発酵培地がフィルター上にポンプ輸送され、細胞を発酵培地から分離し、その後、培地が第２のフィルター上にポンプ輸送され、発酵培地に溶解された他の化合物からたんぱく質を分離し、その後、残った発酵培地からＬ－ドーパが抽出される。

【００１７】

インシチュー製造物回収において、Ｌ－ドーパは例えば種々の吸着樹脂（例えば上に述べられた樹脂）への吸着又は抽出混合物への抽出により抽出され得る。適する再抽出混合物による樹脂の溶出、又は適する再抽出混合物による抽出混合物からのＬ－ドーパの再抽出は、精製されたＬ－ドーパを再抽出混合物中に与える。好ましくはインシチュー製造物回収は、Ｌ－ドーパ及び微生物の細胞を含む発酵ブロスをフィルター上にポンプ輸送し、細胞を発酵培地から分離し、Ｌ－ドーパを発酵培地から反応抽出により抽出混合物へ抽出し、Ｌ－ドーパを再抽出混合物に再抽出により移動させ、細胞及び残った発酵培地を発酵へリサイクルさせる工程を含む。ダウンストリームプロセッシングの特に適する形は、国際特許出願国際公開第００／６６２５３号において記載される反応抽出及び再抽出であり、該公報は参照することにより本明細書に取り込まれる。この書類において、少なくとも１の正に帯電した、及び／又は帯電可能な窒素を含む基を含む有機物質の水性混合物からの抽出及び再抽出は、１２～１８のＣ原子を含む化合物及び少なくとも１のカチオン交換体を少なくとも含む抽出剤を使用することにより、及び水性混合物により、あるいは抽出剤によりぬらすことのできる膜を使用することにより、及び抽出剤から有機物質の水性相への再抽出により行われる。好ましくは本発明に従う方法において、Ｌ－ドーパは、マス（Maass）等、（２００２年）Bioprocess.Biosyst.Eng.,８５～９６ページにおいて記載される反応抽出法を用いることにより、発酵培地から抽出される。該反応抽出はカチオン選択性キャリアー、$D_2$ＥＨＰＡ（ジ－２－エチルヘキシル－ホスホニック酸）を有する有機ケロセン相からなる。有機相はＬ－ドーパを含む発酵培地からＬ－ドーパが有機相へと抽出されることができる膜により分離される。Ｌ－ドーパを含む有機相は、次に膜を通して、硫酸を含む水性ストリッピング相と接触させられ、そしてＬ－ドーパは水性ストリッピング相へと再抽出される。好ましくは本発明に従う方法において、水性ストリッピング相（即ち第２の混合物）は、１～７、好ましくは４～７、より好ましくは５～７、特に５．５～６．８、最も特に６～６．５のｐＨを有する。

【００１８】

発酵培地からのＬ－ドーパの抽出のために特に適する反応抽出は、いわゆる液体－液体遠心分離機によるＬ－ドーパの抽出及び／又は再抽出であり、任意的に他の反応抽出手段と組合わされていてもよい。

【００１９】

本発明のさらに別の実施態様において、発酵の少なくとも一部の間、及びダウンストリームプロセッシング相の少なくとも一部の間、ｐＨは１～７、好ましくは４～７、より好ま

しくは５～７、特に５．５～６．８、最も特に６～６．５に保たれる。好ましくは、発酵の製造相の少なくとも５０％（時間で）、より好ましくは少なくとも６５％、さらにより好ましくは少なくとも８０％、特に９０％、最も特に１００％の間、ｐＨは１～７、好ましくは４～７、より好ましくは５～７、特に５．５～６．８、最も特に６～６．５に保たれ、ダウンストリームプロセッシング相の少なくとも５０％（時間で）、より好ましくは少なくとも６５％、さらにより好ましくは少なくとも８０％、特に９０％、最も特に１００％の間、再抽出混合物のｐＨは、１～７、好ましくは４～７、より好ましくは５～７、特に５．５～６．８、最も好ましくは６～６．５に保たれる。

【００２０】

「抽出混合物」により、発酵培地からＬ－ドーパの抽出に適する溶液が意味される。

【００２１】

「再抽出混合物」により、吸着樹脂又はＬ－ドーパが発酵培地から抽出されたところの抽出培地からのＬ－ドーパの抽出に適する溶液が意味される。

【００２２】

「グリコリシス又はその派生経路」により、グルコース又は別の炭素源をホスホエノールピルベート（ＰＥＰ）へ転化させる微生物の能力が意味される。「ペントースリン酸経路又はその派生経路」によりグルコース又は別の炭素源をエリスロース４－ホスフェート（Ｅ４Ｐ）へと転化させる微生物の能力が意味される。グリコリシス及びペントースリン酸経路の一般的に記載は、ストライヤー（Strayer）、「生化学」第４版、１９９５年、Ｗ．Ｈ．フリーマン・アンド・カンパニー、ニューヨーク、において見出されうる。「芳香族アミノ酸経路又はその派生経路」により、ＰＥＰ及びＥ４ＰをＬ－フェニルアラニン、Ｌ－チロシン、及びＬ－トリプトファンへと転化する微生物の能力が意味される。好ましくは芳香族アミノ酸経路は、Ｌ－チロシンが過剰に製造されるように工学生産される。工学生産は、例えば、ボンガエルツ（Bongaerts）等による芳香族アミノ酸経路のエンジニアリングに関する総説（２００１年）「メタボリックエンジニアリング」第３巻、２８９～３００ページにおいて記載されるように行われる。

【００２３】

例えば、Ｌ－チロシンの過剰製造は以下の方法、コリスメートムターゼ／プレフェネートデヒドラターゼ（例えば微生物における遺伝子の欠損により）をコードする遺伝子の不存在、コリスメート／プレフェネートデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の過剰発現、又はシキミ酸への経路阻害の１つにより達成され得る。

【００２４】

コリスメートムターゼ／プレフェネートデヒドラターゼをコードする遺伝子の例は、Escherichia coliのpheA、Erwinia herbicolaのpheA、Haemophilus influenzaのpheAである。例えば微生物において、この酵素をコードする遺伝子は、当業者に公知であるノックアウト法により欠損されることができる。Escherichia coli K-12の染色体遺伝子の不活性化のためのノックアウト法が、ダツェンコ等（２０００年）によりProc. Natl. Acad. Sci. USA, 第９７巻、６６４０～６６４５ページに記載されている。

【００２５】

コリスメートムターゼ／プレフェン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の例は、Escherichia coliのtyrA遺伝子である。

【００２６】

シキメートへの経路は、グローバル制御因子tyrRの破壊によりE.coliにおいて阻害され得る。

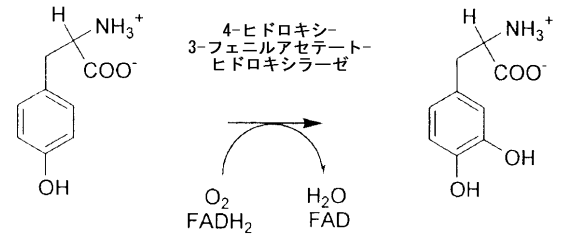
【００２７】

本発明に従う方法において、「Ｌ－チロシン－３－ヒドロキシ－モノ－オキシゲナーゼ活性」により、３－位におけるＬ－チロシンのヒドロキシル化を触媒する能力が意味される。この能力を有する酵素の例は：モノ－オキシゲナーゼ又はヒドロキシラーゼ、例えば４－ヒドロキシフェニルアセテート３－ヒドロキラーゼである。本発明の好ましい実施態様において、Ｌ－チロシン－３－ヒドロキシ－モノ－オキシゲナーゼ活性は、ヒドロキシラ

ーゼ活性を有する酵素であり、より好ましくは４－ヒドロキシフェニルアセテート３－ヒドロキシラーゼ活性を有する酵素、例えばクサン等によりAppl. Environ. Microbiol. (２０００年)、第６６項、第２号、４８１～４８６ページにおいて記載されたものである。４－ヒドロキシフェニルアセテート３－ヒドロキシラーゼ活性は、分子状酸素（$O_2$）及び還元されたフラビンアデニンジヌクレオチド（$FADH_2$）の消費を伴ってＬ－チロシンをＬ－３，４－ジヒドロキシフェニルアラニンに酸化する能力である。（クサン等、（２０００年）Appl. and Envir.Microbiology, 第６６巻、第２号、４８１～４８６ページ及び下の図１もまた参照のこと）。

【００２８】

【化１】




L-チロシン　　L-ドーパ

図 (1)

【００２９】

もし本発明において使用される微生物が自然にＬ－チロシン－３－ヒドロキシ－モノ－オキシゲナーゼ活性を生み出さないのであれば、４－ヒドロキシフェニルアセテート３－ヒドロキシラーゼ活性を有する酵素（４－ヒドロキシフェニルアセテート３－ヒドロキシラーゼとしてもまた知られる）をコードする遺伝子の、微生物中の適するベクターへのクローニング及び発現、好ましくは過剰発現により、微生物はこの活性を生み出すように変化され得る。Ｌ－チロシン－３－ヒドロキシ－モノ－オキシゲナーゼをコードする遺伝子の例は、Bacillus thermoleovoransからのフェノールヒドロキシラーゼをコードするPheA、Klebsiella pneumoniaからの４－ヒドロキシフェニルアセテート３－ヒドロキシラーゼをコードするHpaA、Escherichiacoliからの４－ヒドロキシフェニルアセテート３－ヒドロキシラーゼをコードするhpaBである。好ましくは、４－ヒドロキシフェニルアセテート３－ヒドロキシラーゼをコードする遺伝子はEscherichia coli ATCC11105からのhpaB遺伝子である。

【００３０】

好ましくは、本発明に従う方法において、$FADH_2$－ＮＡＤ－オキシドレダクターゼをコードする遺伝子をもまた発現する、好ましくは過剰発現する微生物が使用される。$FADH_2$－ＮＡＤ－オキシドレダクターゼは４－ヒドロキシフェニルアセテート３－ヒドロキシラーゼの活性を向上させる（クサン等（２０００年）、Appl. Environ. Microbiol.、第６６巻、４８１～４８６ページ）。もし微生物が$FADH_2$－ＮＡＤ－オキシドレダクターゼをコードする遺伝子を自然の状態で有していないならば、あるいは遺伝子の発現が低すぎるならば、微生物は、この遺伝子を発現するように変化され得る。例えばもし遺伝子が自然の状態で、微生物に存在するならば、$FADH_2$－ＮＡＤ－オキシドレダクターゼをコードする遺伝子が適切なベクターにおいてクローン化されて微生物に導入されて、次に発現され得る。$FADH_2$－ＮＡＤ－オキシドレダクターゼをコードする遺伝子は、例えばギャラン（Galan）等によりJ.Bacetiol.第１８２巻、６２７～６３６ページにおいて記載されており、例えばEscherichia coli ATCC11105BからのhpaC遺伝子、Escherichia coliのfre遺伝子、K.pneumoniからのhapH遺伝子、B. pickettiiからのhdaB遺伝子等である。

【００３１】

好ましくは、４－ヒドロキシフェニルアセテート３－ヒドロキシラーゼ及びＦＡＤＨ$_2$－ＮＡＤ－オキシドレダクターゼをコードする遺伝子は、微生物において過剰発現される。過剰発現は当業者に公知の方法、例えば遺伝子の１以上の複製を微生物に導入すること（例えばマルチコピーベクター上に又は直接ゲノムに）、及び／又は該遺伝子の前に適切なプロモーターを置くことにより達成され得る。

【００３２】

好ましくは本発明に従う方法において、フィードバック耐性である３－デソキシ－Ｄ－アラビノ－ヘプツルソネート－７－ホスフェート（ＤＡＨＰ）合成酵素をコードする遺伝子を過剰発現する微生物が使用される。好ましくは、そのような微生物は、微生物のゲノム中のフィードバック制御された３－デソキシ－Ｄ－アラビノ－ヘプツロソネート－７－ホスフェート合成酵素をコードする野生型の遺伝子の欠損及びフィードバック耐性の３－デソキシ－Ｄ－アラビノ－ヘプツロソネート－７－ホスフェート合成酵素をコードする遺伝子よる欠損の補完（complementation）による得られる。例えばE. coli中のＬ－チロシンフィードバック制御された３－デソキシ－Ｄ－アラビノ－ヘプツロソネート－７－ホスフェート合成酵素をコードするaroF野生型遺伝子の欠損、及び続くＬ－チロシンフィードバック耐性の３－デソキシ－Ｄ－アラビノ－ヘプツロソネート－７－ホスフェート合成酵素をコードするE. coli遺伝子aroF$^{FBR}$による該欠損された遺伝子の補完が、ジョッセク（Jossek）等によりFEMS Microbiol. Lett.第２０２巻、１４５～１４８ページ（２００１年）に記載されている。

【００３３】

公知の配列を有するベクターの適する遺伝子へのクローニング、ホスト微生物中への導入、及び該遺伝子を発現させて所望される酵素（例えば４－ヒドロキシフェニルアセテート３－ヒドロキシラーゼ）を製造することは標準的なテクニックであり、当業者に公知である（例えばサムブルック（Sambrook），J.，フリッシュ(Fritsh)，E. F.，及びマニアチス(Maniatis),T.「分子クローニング：実験室マニュアル（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）」第２版コールドスプリングハーバー研究所（Cold Spring Harbor Laboratory），コールドスプリングハーバー研究所出版，コールドスプリングハーバー，ニューヨーク、１９８９年）。

【００３４】

適するベクターは、クローニング及び発現のために通常使用されるベクターであり、当業者に公知である。E. coliにおける発現のための適するベクターの例は、例えばマクライド(Makrides),S. C. Microbiological Reviews,（１９９６年）、第６０巻、第３号、５１２～５３８ページにおける表１に与えられる。Bacillusにおける発現のための適するベクターは、例えばWang等（１９９２年）、Biotechn.第２２巻、３３９～３４７ページ記載されており、Corynebacteriumにおける発現のための適するベクターは、例えばデブ（Deb）等、（１９９９年）FEMS Microbiol.Lett.第１７５巻、第１号、１１～２０ページに記載されている。

【００３５】

ベクターにクローン化された遺伝子の発現のために、プロモーターが、所望される酵素をコードする遺伝子を含むベクター中のクローニングサイトの上流に通常配置される。適するプロモーターは、いくつか例を挙げると、ファージラムダＰＬプロモーター、E. coliのlac、trp、及びtacプロモーター、SV40の初期及び後期プロモーター及びレトロウィルスLTRのプロモーターである。

【００３６】

また本発明における使用に適するのは、スイッチをオン及びオフできるプロモーターであり、例えばlacプロモーター、araBADプロモーター、tacプロモーター、$T_7$プロモーター、trcプロモーター、及びtrpプロモーターである。

【００３７】

過剰発現のために、強力なプロモーター、例えばE. coliのtacプロモーターが使用され得る。

【００３８】
ベクターの選択は、宿主として使用される微生物に依存することがある。もし例えばaraBADプロモーターを有するベクターが使用されているならば、アラビノースインデューサーを分解できないE. coli宿主株が強く好まれる。
【００３９】
「炭素源」により、微生物によりＥ４Ｐ及びＰＥＰに転化され得る化合物が意味される。
【００４０】
本発明に従う方法において適切に使用され得る炭素源は、オリゴサッカライド及びジサッカライド、例えばマルトース、β－ガラクトシド、メリビオース、エピメリビオース、ガラクチノール、メリビトール、ガラクトシルグリセロール、及びトレハロース、ヘキソース、例えばＤ－グルコース、Ｄ－フルクトース、Ｄ－マンノース、Ｌ－ソルボース、及びＤ－ガラクトース、アミノ糖、例えばＮ－アセチル－Ｄ－グルコサミン及びＤ－グルコサミン、メチルペントース、例えばＬ－フルコース、及びＬ－ラムノース、ペントース及びトリオース、例えばＬ－アラビノース、Ｄ－アラビノース、Ｄ－キシロース、キシリトール、Ｄ－リキソース、Ｄ－リボース、２－デオキシ－Ｄ－リボース及びジヒドロキシアセトン、ヌクレオシド及びデオキシヌクレオシド中のペントース、例えばシチジン、デオキシシチジン、アデノシン、デオキシアデノシン、ウリジン、キサントシン、チミジン（デオキシウリジン）、プリン（アデニン、ヒポキサシン、グアニンリボヌクレオシド）、ヘキスウロナイド、ヘキスウロネート及びヘキソネート、例えばＤ－グルコネート及びＤ－ガラクトネート、リン酸化された糖及びカルボキシレート、例えばヘキソースホスフェート、及びｓｎ－グリセロール３－ホスフェート、ジカルボキシレート、例えばスクシネート、フマレート、及びＬ－マレート、トリカルボン酸、ポリオール、例えばＤ－マンニトール、Ｄ－グルシトール、Ｄ－ソルビトール、ガラクチトール、ドゥルシトール、Ｄ－アラビトール、リビトール及びキシリトール、グリセロール、２炭素化合物及び脂肪酸、例えばアセテート、脂肪酸、グリコレート、及びグリオキシレートである。好ましくは使用された炭素源はグルコースである。
【００４１】
本発明において適切に使用され得る微生物属の例は、Escherichia、好ましくはEscherichiacoli、Bacillus、Corynebacteriumである。本発明の方法において、微生物はＬ－チロシン－３－ヒドロキシ－モノ－オキシゲナーゼ活性を有することが本質的である。もし選択された微生物が天然にはこの活性を有しないならば、微生物は、この活性を有するように変化されなければならない（上を参照のこと）。好ましくは、使用される微生物は、Escherichia coli K12株、最も好ましくはEscherichia coli W3110又はLJ110である。例えば非常に適する微生物は、プラスミドpACYC tac aroF$^{FBR}$ tyrA及びpJFl19EHhpaB hpaCを追加されたEscherichiacoli W3110である。
【００４２】
当業者は、微生物の発酵を行う方法を知っており、どの発酵培地が該微生物に適切であるか知っている。例えばEscherichia coliの発酵に適する発酵培地は、タナカ（Tanaka）等、（１９６７年）、J. Bact. 第９３巻、６４２～６４８ページ、パン（Pan）等（１９８７年）, Biotechn.Lett.第９巻、８９～９４ページ, ゲリグク（Gerigk）等（２００２年）、Bioprocess及びBiosystems Engineering第２５巻、４３～５２ページに記載されている。
【００４３】
本発明は以下の実施例により説明される。しかし、これらの実施例は本発明を制限することを意図されない。
【実施例】
【００４４】
実験の部
一般的手順
標準的な分子クローニングテクニック、例えばＤＮＡ単離、ゲル電気泳動、核酸の酵素制

限修飾、Escherichia coliの形質転換等は、サムブルック（Sambrook）等著、１９８９年、「分子クローニング：実験室のマニュアル」、コールド・スプリング・ハーバー研究所、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨークにより記載されたように行われた。合成オリゴデオキシヌクレオチドは、ＭＷＧ－バイオテックＡＧ、エバースベルグ、から得られた。ＤＮＡ配列解析は、染料でラベルされたジデオキシ－ターミネーターを用いる鎖停止法を用いて行われた。

【００４５】

プラスミドpJF119EH aroF$^{fbr}$ tyrA及びpJF119EH hpaBC

フィードバック耐性の（DAHP）合成酵素（aroF$^{fbr}$）及びコリスメートムターゼ／プレフェネートデヒドロゲナーゼ（tyrA）をコードする人工オペロンの発現ベクター、及びオペロン３－ヒドロキシフェニルアセテート－４－ヒドロキシラーゼ（hpaB）及びフラビンＮＡＤＨオキシドレダクターゼ（hpaC）を構築するベクターとしてプラスミドpJF119EHが選択された。このベクターは、フェルステ（Fuerste）ら（１９８６年、遺伝子（Gene）、第４８巻、１１９～１３１ページ）により構築され、このベクターは種々のグラム陰性菌におけるたんぱく質の発現に適する。pJF119EH系はイソプロピル－ベーター－Ｄ－チオガラクトピラノシド（IPTG）誘導性tacプロモーター及びlacリプレッサー系（lacl$^{Q}$遺伝子）を使用し、これはクローン化された外部遺伝子の発現をインデューサーの不存在下において非常に低く保つことを許す。プラスミドpJF119EHは起点colE1を有し、これはプラスミドpACYCtacの起点p15aと矛盾しない。フィードバック耐性DAHP合成酵素をコードする遺伝子aroF$^{fbr}$は、ジョッセク等により２００１年、FEMS Microbiol. Lett第２０２号、１４５～１４８ページに述べられているプラスミドpJFaroF$^{fbr}$から由来する。

【００４６】

フィードバック耐性DAHP合成酵素（AroF (N8K)）は、Ｌ－チロシンフィードバックセンシティブ DAHP合成酵素（AroF）の８位におけるアミノ酸アスパラギンをイソロイシンにより置換することにより達成される（ジョッセク等、２００１年、FEMS Microbiol.Lett.、第２０２号、１４５～１４８ページ）。遺伝子tyrAは、野生型Escherichiacoli株W3110 （ATCC 27325）から由来し、hpaB及びhpaCからなるオペロンはEscherichia coli ATCC 11105に由来する（Davis等、１９５１年、サイエンス、第１１４巻、４５９ページ）。プラスミドpJF119EH aroF$^{fbr}$tyrA及びpJF119EH hpaBhpaCの構築が実施例１及び３に記載される。

【００４７】

プラスミドpACY tacaroF$^{fbr}$ tyrA

フィードバック耐性（DAHP）合成酵素（aroF$^{fbr}$）及びコリスメートムターゼ／プレフェネートデヒドロゲナーゼ（tyrA）をコードする発現ベクターとして、プラスミドpACYCtacが使用された。プラスミドpACYCtacは、種々のグラム陰性菌におけるたんぱく質発現に適するベクターpACYCtac184（チャン（Chang）及びコーエン（Cohen）、１９７８年J. Bacteriol.第１３４巻、１１４１～１１５６ページ）に基づく。pACYCtac184は、イソプロピル－ベーター－Ｄ－チオガラクトピラノシド（IPTG）誘発性tacプロモーター及びlacリプレッサー系（lacl$^{Q}$遺伝子）を使用し、このことは、クローン化された外部遺伝子の発現をインデューサーの不存在下で、非常に低く保つことを許す。プラスミドpACYCtac184は起点p15aを有し、それはpJF119EHのcolE1の起点と矛盾しない。

【００４８】

pACYC tacの構築

pACYCtacの構築のため、pACYCtac184が、製造業者（インビトロジェン社）の指示に従って、Hindlll及びNrulで消化された。ゲル電気泳動により、３３００塩基対フラグメントが約９４０塩基対から分離され、該３３００塩基対フラグメントは、製造業者（キアゲン社）の指示に従ってアガロースゲルから精製された。

【００４９】

再び、HindIII及びNurlでプラスミドpZY507（ワイサー（Weisser）等、１９９５年、J. Bacteriol.第１７７巻；３３５１～３３４５ページ）が（製造業者（インビトロジェン社

）の指示に従って）開かれ、約１６００塩基対の小さい方のフラグメントがゲル電気泳動により分離され、（製造業者（キアゲン社）の指示に従って）ゲルから溶出され、製造業者（ロシュ（Roche））の指示に従ってＴ４リガーゼを用いて、pACYCtac184骨格の約３３００塩基対と連結され、プラスミドpACYC tacを生じた。

【００５０】

プラスミドpACYC tacaroF$^{fbr}$ tyrAの構築は実施例２に記載される。

【００５１】

実施例１：プラスミドpJF119EH aroF$^{fbr}$tyrAの構築

Escherichia coliコリスメートムターゼ／プレフェネートデヒドロゲナーゼ（アクセション番号ＡＥ０００３４６のヌクレオチド５８７７～４７４０によりコードされている）をコードするtyrAのオープン・リーディング・フレーム（ＯＲＦ）が、プライマーとして、（アンダーラインされたXbal制限サイトを有する）５'－ＣＴＧＡＣＧＧＣＴＣＴＡＧＡＧＧＣＴＴＡＡＧＴＧＡＴＴＴＡＴＴＡＴＧＧ－３'及び（アンダーラインされたSphl制限及び開列サイトを有する）５'－ＡＴＣＡＧＣＡＴＧＣＡＣＴＧＡＡＴＴＣＴＴＡＣＴＧＧＣＧＡＴＴＧＴＣ－３'（供給者ＭＷＧにより提供された）を、及び鋳型として野生型Escherichia coli株Ｗ３１１０の染色体ＤＮＡを使用して増殖された。ゲノムＤＮＡは商業的供給者（マシェルリ(Macherery）及びナーゲル（Nagel））のマニュアルに従って単離された。

【００５２】

ＰＣＲはプラチナPfxDNAポリメラーゼ（ライフテクノロジーズ社（Life Technologies）により提供された）を用いて、製造業者のマニュアルに従って行われた。約１２００塩基対の、得られたＤＮＡ増殖製造物はゲル抽出（キアゲン）により精製され、供給者（インビトロジェン社）のマニュアルに従ってXbal及びSphlで制限され、次に製造業者のマニュアルの指示に従ってＴ４リガーゼで、同じようにしてXbal及びSphlで既に消化されたベクターpJF119EH aroF$^{fbr}$（ジョッセク等、２００１年、FEMS Microbiol.Lett.第２０２号：１４５～１４８ページ）の中へ供給者（ロシュ）の指示に従って連結された。製造業者（ライフテクノロジーズ）の指示に従ってアンピシリン（１００ｍｇ／ｌ）を有するＬＢブロスベース寒天（１．５％）プレート上で選択して、形質転換が株ＤＨ5α（ライフテクノロジーズ社により提供された）へと実行された。成功したクローニングは、クローン化されたtyrA遺伝子の正しい配列を測定することにより検出された。正しい配列を示すプラスミドは、pJF119EH aroF$^{fbr}$tyrAと示された。

【００５３】

実施例２：プラスミドpACYC tacaroF$^{fbr}$tyrAの構築

プラスミドpJF119EH aroF$^{fbr}$tyrAが、Mlul及びSphlで開かれ、約３０００の塩基対フラグメントがゲル電気泳動により単離され、次に精製された。プラスミドpACYCtacはMlul及びSphlで製造者（インビトロジェン社）の指示に従って処理され、４１００の塩基対フラグメントを与え、該フラグメントは（供給者ロシュの指示に従って）Mlul及びSphlで処理されたpJF119EH aroF$^{fbr}$tyrAの３０００の塩基対と連結された。成功したクローニングは正しい挿入サイズを測定することにより検出された。正しい挿入サイズを明らかにするプラスミドはpACYCtac aroF$^{fbr}$tyrAと呼ばれた。

【００５４】

E. coli株DH5α/pACYCtac aroF$^{fbr}$tyrA、プラスミドpACYCtac aroF$^{fbr}$tyrAを含有するE. coli DH5αは、ブダペスト条約の下、２００２年7月２３日にＤＳＭ１５１１０の番号の下で、ＤＳＭＺ（微生物及び細胞培養物のドイツの寄託機関（Deutsche Sammlungvon Mikroorganismen und Zellkulturen）、ブラウンシュバイク、ドイツ）に寄託された。

【００５５】

実施例３：プラスミドpJF119EH hpaBhpaCの構築

Escherichia coli株ATCC11105は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（マナサス、バージニア州、アメリカ合衆国）から得られた。Escherichia coli ATCC11105の培養の為に、以下の培地成分、２．０ｇの酵母エキス、２．０ｇのカゼイン加水分解物、

７．０gの$K_2HPO_4$、３．０gの$KH_2PO_4$、０．５gのクエン酸ナトリウム・３$H_2O$、０．１gの$MgSO_4$・$7H_2O$、１．０gの（$HH_4$）$_2SO_4$、２．０gのグルコース（濾過滅菌されたもの）が１リットルの蒸留水中に添加された。最終的なｐＨが７．０に調節された。Escherichia coli ATCC11105のゲノムＤＮＡが市販のゲノム精製キット（マシェルリ及びナーゲル）の指示に従って単離された。

【００５６】

Escherichia coli ATCC11105の３－ヒドロキシフェニルアセテート－４－ヒドロキシラーゼ及びフラビンＮＡＤＨオキシドレダクターゼをコードするhpaB及びhpaCのオープン・リーディング・フレーム（ＯＲＦＳ）（アクセションＺ２９０８１のヌクレオチド１１１２－２６４７（hpaB）又は２６９２－３２０４（hpaC）によりコードされた）が、プライマーとして５’－ＡＴＣＧＧＧＡＴＣＣＧＡＴＴＡＡＴＡＣＴＧＴＡＧＡＧＧＴＣＧＡＣＡＴＧＡ－３’（アンダーラインを引かれたBamHl制限サイトを有する）及び５’－ＡＡＴＧＡＡＧＣＴＴＣＧＡＣＧＡＡＴＧＣＧＴＧＡＡＧＧＧＧＣＴＧＧＡＧＣ－３’（アンダーラインされたHindIII識別及び開裂サイトを有する）を、及び鋳型としてATCC11105の染色体ＤＮＡを使用して、増殖された。得られた約２１００塩基対のＤＮＡ増殖製造物は、ゲル電気泳動により精製され、製造者（キアゲン社）の指示に従ってゲルから溶出され、製造者（インビトロジェン社）の指示に従ってBamHI及びHindlllで制限され、次に製造者（ロシュ）の指示に従ってＴ４リガーゼで、同じようにすでに処理されていたベクターpJF119EH（フュルスト等、「遺伝子（Gene）」，第４８巻、１１９～１３１ページ）中へ連結された。製造者（ライフテクノロジーズ社）の指示に従って、アンピシリン（１００ｍｇ／１）を有するＬＢブロスベース寒天（１．５％）プレート上で選択して、$CaCl_2$処理されたコンピタント株DH5α（ライフテクノロジーズ社により供給された）へと形質転換が実行された。成功したクローニングが遺伝子の配列を決定することにより検出された。ＰＣＲが製造者（ロシュ）の指示に従ってＤＮＡポリメラーゼを用いて行われた。

【００５７】

E. coli株DH5α/pJF119EH hpaB hpaC, プラスミドpJF119EHhpaB hpaCを含有するE.coli DH5αは、ブダペスト条約の下、２００２年７月２３日にＤＳＭ１５１０９の番号の下で、ＤＳＭＺ（微生物及び細胞培養物のドイツの寄託機関（Deutsche Sammlung von Mikroorganismenund Zellkulturen）、ブラウンシュバイク、ドイツ）に寄託された。

【００５８】

実施例４：Ｌ－ドーパ生産株の構築

Ｌ－ドーパ生産のホストとして、W3110と表示されるEscherichia coli K12が選択された（ATCC27325）。プラスミドpACYCtac $aroF^{fbr}$ tyrA（実施例２）上に付与された遺伝子$aroF^{fbr}$及びtyrAの複製のW3110株への導入及び発現は、Ｌ－ドーパ、Ｌ－チロシンの前駆体の生産をもたらす。

【００５９】

pACYCtac $aroF^{fbr}$ tyrA（実施例２）の形質転換は、製造者（ライフテクノロジーズ）の指示に従って、クロラムフェニコール（２５ｍｇ／ｌ）を有するＬＢブロスベース寒天（１．５％）プレート上で選択して、$CaCl_2$処理されたコンピタント株W3110へと実行された。構築された株は、W3110pACYCtac $aroF^{fbr}$ tyrAと示された。

【００６０】

Ｌ－チロシンからＬ－ドーパの水酸化を可能にするため、プラスミドpJF119EH hpaBhpaCは、$CaCl_2$処理されたコンピタント株W3110pACYCtac $aroF^{fbr}$ tyrAへと形質転換され、クローンは、製造者（ライフテクノロジーズ）の指示に従って、クロラムフェニコール（１２．５ｍｇ／ｌ）及びアンピシリン（５０ｍｇ／ｌ）を有するＬＢブロスベース寒天（１．５％）プレート上で選択された。構築されたのは、E. coli W3110/pACYCtac $aroF^{fbr}$ tyrA/pJF119EHhpaB hpaCであった。

【００６１】

実施例５：フラスコ振とうにおけるグルコースからのＬ－ドーパの発酵的製造

鉱物性培地は、クエン酸ナトリウム・３$H_2O$（１．０g・$l^{-1}$）、$MgSO_4$・７H

$_2$O（0．3g・l$^{-1}$）、$KH_2PO_4$（3．0g・l$^{-1}$）、$K_2HPO_4$（12．0g・1$^{-1}$）、NaCl（0．1g・l$^{-1}$）$(NH_4)_2SO_4$（5．0g$^{-1}$）、$CaCl_2$・$2H_2O$（15．0mg・l$^{-1}$）、$FeSO_4$・$7H_2O$（75．0mg・l$^{-1}$）、チアミン・HCI（ビタミンB1）（5．0mg・l$^{-1}$）から構成された。追加の鉱物が、微量元素溶液の形（1ml・l$^{-1}$）で添加され、該溶液は、$Al_2(SO_4)_3$・$18H_2O$（2．0g・l$^{-1}$），$CoCl_2$・$6H_2O$（0．7g・l$^{-1}$），$CuSO_4$・$5H_2O$（2．5g・l$^{-1}$）、$H_3BO_3$（0．5g・l$^{-1}$）、$MnCl_2$・$4H_2O$（20．0g・l$^{-1}$）、$Na_2MoO_4$・$2H_2O$（3．0g・l$^{-1}$）、$NiSO_4$・$6H_2O$（2．0g・l$^{-1}$），$ZnSO_4$・$7H_2O$（15．0g・l$^{-1}$）から構成されていた。グルコースの一水和物のストック溶液（500g・l$^{-1}$）は独立してオートクレーブ処理に付され、4g・l$^{-1}$グルコースの最終濃度まで滅菌された培地に添加された。

【0062】

エタノールに溶解され、滅菌濾過された、クロラムフェニコールのストック溶液（50mg／ml）から、12．5mgl$^{-1}$の最終濃度のクロラムフェニコールが製造された。水に溶解され、滅菌濾過されたアンピシリンのストック溶液から、50mg／lの最終濃度が製造された。

【0063】

1．5%の寒天が添加されているところの、鉱物性培地の寒天プレート（組成については上の参照のこと）において一晩成長された、Escherichia coliW3110/pACYCtac aroF$^{fbr}$ tyrA/pJF119EH hpaB hpaCのシングルコロニーが使用されて、10mlの最小培地を含む100mlの振とうフラスコに接種し、33℃において16時間培養された。次に約0．5mlのこの培養物が使用されて、500mlの振フラスコ中の50mlの同じ培地に接種し、33℃及び180rpmにおいて24時間培養された。3時間後、約0．2の$OD_{620nm}$において、細胞は0．1mMのイソプロピル－ベータD－チオガラクトピラノシド（IPTG）を添加することにより誘発された。24時間後、L－ドーパ濃度のHPLC分析のために培養サンプルが採取された。

【0064】

HPLC分析を行うために、ダイオードアレイ検出器を有するアエジラント（Aegilent）社（ワルドブロン（Waldbronn）、ドイツ）のHPLC1100システムが使用された。化合物は200nmの波長において測定された。マシェルリーナーゲル社製のヌクレオシル－120－5－C18カラム（250×4mm）が固相として使用された。カラムは溶出液A（10mMの$H_3PO_4$）及び溶出液B（100%アセトニトリル）から始まる勾配を使用して溶出された。勾配：0分2%B，25分まで90%B，27分～30分2%B。溶出速度は、1．2ml／分に設定され、カラム温度は40℃に設定された。

【0065】

L－ドーパ用にHPLCを調整するため、L－ドーパが純水に溶解された。これらの条件下、4．4分の保持時間がL－ドーパについて観測された。

【0066】

HPLC分析は、24時間後において、30mg／lのL－ドーパの製造を明らかにした。

【0067】

実施例6．供給－バッチ発酵（fed-batch fermentation）によるグルコースからのL－ドーパの発酵的製造

鉱物性培地は、クエン酸ナトリウム・$3H_2O$（1．5g・l$^{-1}$）、$MgSO_4$・$7H_2O$（0．9g・l$^{-1}$）、$KH_2PO_4$（3．0g・l$^{-1}$）、NaCl（1g・l$^{-1}$）、$(NH_4)_2SO_4$（5．0g・l$^{-1}$）、$CaCl_2$・$2H_2O$（15．0mg・l$^{-1}$）、$FeSO_4$・$7H_2O$（112．5mg・l$^{-1}$）、チアミン・HCI（ビタミンB1）（7．5mg・l$^{-1}$）から構成された。

追加の鉱物が、微量元素溶液の形（1．5ml・l$^{-1}$）で添加され、該溶液は、$Al_2$

（$SO_4$）$_3$・$18H_2O$（2．0g・$l^{-1}$），$CoCl_2$・$6H_2O$（0．7g・$l^{-1}$）、$CuSO_4$・$5H_2O$（2．5g・$l^{-1}$）、$H_3BO_3$（0．5g・$l^{-1}$）、$MnCl_2$・$4H_2O$（20．0g・$l^{-1}$）、$Na_2MoO_4$・$2H_2O$（3．0g・$l^{-1}$）、$NiSO_4$・$6H_2O$（2．0g・$l^{-1}$），$ZnSO_4$・$7H_2O$（15．0g・$l^{-1}$）から構成されていた。グルコースの一水和物のストック溶液（500g・$l^{-1}$）は独立してオートクレーブ処理に付され、20g・$l^{-1}$グルコースの最終濃度まで滅菌された培地に添加された。

【0068】

エタノールに溶解され、滅菌濾過された、クロラムフェニコールのストック溶液（50mg／ml）から、12．5mg・$l^{-1}$の最終濃度のクロラムフェニコールが製造された。水に溶解され、滅菌濾過されたアンピシリンのストック溶液（50mg・$l^{-1}$）から、50mg・$l^{-1}$の最終濃度が製造された。

【0069】

アンピシリン（50mg・$l^{-1}$）及びクロラムフェニコール（12．5mg・$l^{-1}$）を有するLBブロスベース寒天（1．5%）プレート上で、一晩成長されたEscherichia coliW3110/pACYCtac $aroF^{fbr}$ tyrA/pJF119EH hpaB hpaCのシングルコロニーが、50mlの、アンピシリン（50mg・$l^{-1}$）及びクロラムフェニコール（12．5mg・$l^{-1}$）を有するLBブロスベース50mlを含む、500mlの振とうフラスコに接種するために使用され、約1．0の$OD_{620nm}$に到達するまで33℃において培養された。該培養物に50mlのグリセロール（85%）が添加され、細胞は2mlの極低温バイアル（ナルジーン（Nalgene））に満たされ、ついで－70℃において貯蔵された。

【0070】

予備培養の準備のために、100mlの鉱物性培地（組成については実施例5を参照のこと）を含む1000mlの振とうフラスコが、10g・$l^{-1}$のグルコース濃度以外は、使用された。振とうフラスコは100μlのEscherichia coli W3110/pACYCtac $aroF^{FBR}$ tyrA/pJF119EHhpaB hpaCの冷凍されたグリセロール細胞ストックを接種され、33℃において14時間培養された。200mlの予備培養物が発酵器の接種のために使用された。

【0071】

発酵器における培養は、2．0Lのバイオリアクター（ラボフォース（Labfors）、インフォース（Infors）、スイス）において10%の接種で行われ、33℃において培養された。培養はpH6．7から始まった。鉱物性の発酵培地（上の組成を参照のこと）は、較正されたpHセンサー及び酸素センサーと一緒にバイオリアクター中で直接滅菌された。

【0072】

pHは17．5%$NH_4OH$（1：2希釈）及び5NKOH溶液により調整された。独立したグルコースのフィード（500g・$l^{-1}$）が、$OD_{620nm}$が5より高くなったとき開始された。約14時間後に到達されたところの$OD_{620nm}$10において、イソプロピル－ベーター－D－チオガラクトピラノシド（IPTG）が0．1mMの最終濃度まで添加された。誘発後7．5時間後、培地のpHはpH6．7からpH0．2単位の段階で30分内に最終のpH5．8まで下げられた。

【0073】

バイオマス$OD_{620nm}$及びL－ドーパ濃度が、時間の関数としてHPLC分析（HPLCの条件については実施例5を参照のこと）により測定された（表1を参照のこと）。43時間におけるL－ドーパの濃度は10であった。

【0074】

【表１】

表１　pHシフトのある発酵：

| 時間[時] | バイオマス ($OD620_{nm}$) | 相対L-ドーパ濃度 |
|---|---|---|
| 15.75 | 15.6 | 0.18 |
| 16.75 | 20.3 | 1.3 |
| 17.75 | 22.9 | 1.8 |
| 19 | 25.7 | 2.7 |
| 20.5 | 27.4 | 5.3 |
| 22 | 26.7 | 6.8 |
| 24 | 26.5 | 9.5 |
| 39.25 | 33 | 9.6 |
| 43 | 33 | 10 |

【００７５】

実施例７．ｐＨの低下なしの比較例の発酵

以下の相違点をもって実施例６のように発酵が行われた：

・ｐＨは低下されなかった

・$OD_{620nm}$５（７時間後に到達された）において、ＩＰＴＧが添加された。

【００７６】

発酵の結果は、下の表２に示される。３２時間後に到達されたＬ－ドーパ濃度は１０であった。

【００７７】

【表２】

表２　pHシフトなしの発酵

| 時間[時] | バイオマス(OD620nm) | 相対L-ドーパ濃度 |
|---|---|---|
| 4.00 | 1.88 | 0 |
| 6.75 | 5.34 | 0 |
| 8.00 | 9.02 | 0 |
| 9.50 | 14.20 | 0.76 |
| 10.50 | 17.13 | 1.6 |
| 13.75 | 26.00 | 5.3 |
| 24.50 | 37.30 | 13 |
| 26.00 | 41.32 | 11 |
| 28.25 | 37.60 | 10.5 |
| 30.25 | 38.20 | 10.1 |
| 32.00 | 39.10 | 10 |

【００７８】
表１及び表２から結論付けられ得るように、Ｌ－ドーパは、発酵中にｐＨ６．７～ｐＨ５．８のｐＨシフトが適用される発酵においては安定であるのに対し、ｐＨシフトが適用されない、ｐＨ６．７における発酵においては、L-ドーパはより不安定である。
【００７９】
実施例８．Ｌ－ドーパの反応抽出
実施例６に記載されたように製造され、ｐＨ７．５に調節された、Ｌ－ドーパが存在するところの発酵ブロスの試料（試料Ａ）が使用された。１０％の$D_2$ＥＨＰＡ（ｐＨ酸性）を含む５ｍｌのケロセンが、同じ体積の試料Ａとボルテックスミキサーで３０秒間激しく混合された。２相の分離後（約１０分後）、Ｌ－ドーパ抽出培地（試料Ｂ）を含む水相が室温において貯蔵された。有機相に溶解されたＬ－ドーパは、２ｍｌの有機相を１ＭＫＣｌ（ｐＨ＝６．３）と３０秒間激しく振とうして混合することにより再抽出された。２つの相の分離後（約１０分）、Ｌ－ドーパを含む水相、再抽出培地（試料Ｃ）が室温において貯蔵された。試料Ａ，Ｂ，Ｃは室温において６００時間、貯蔵され、Ｌ－ドーパの濃度が、（６００時間までの）時間の数点において測定された。Ｌ－ドーパ濃度はＨＰＬＣ分析により時間の関数として測定された（表３を参照のこと）。
【００８０】
【表３】

表３：

| 時間[時] | 未処理の発酵ブロスの相対Ｌ－ドーパ濃度（試料Ａ、ｐＨ＝７．５） | ケロセン／$D_2$ EHPAにより抽出された発酵ブロスの水相の相対Ｌ－ドーパ濃度（試料Ｂ、ｐＨ酸性） | ＫＣｌにより再抽出された有機相の相対Ｌ－ドーパ濃度（試料Ｃ、ｐＨ＝６．３） |
|---|---|---|---|
| 24 | 0.7 | 0.8 | 0.3 |
| 96 | 0.7 | 0.7 | 0.3 |
| 168 | 0.6 | 0.7 | 0.3 |
| 336 | 0.5 | 0.8 | 0.4 |
| 408 | 0.4 | 0.7 | 0.4 |
| 504 | 0.4 | 0.8 | 0.4 |
| 600 | 0.3 | 0.7 | 0.4 |

【００８１】
該結果から、ケロセン／$D_2$ＥＨＰＡ抽出なしでは、発酵ブロスのＬ－ドーパ濃度はＬ－ドーパの不安定性のために貯蔵時間の間に減少することが結論付けられ得る。ケロセン／$D_2$ＥＨＰＡ（酸性ｐＨ）による発酵ブロスの抽出後は、Ｌ－ドーパの濃度の低下はほとんど防止され、そのことから、ケロセン／$D_2$ＥＨＰＡによる抽出はＬ－ドーパを安定化すると結論付けることができる。ＫＣｌ（ｐＨ＝６．３）によるＬ－ドーパの再抽出後は、Ｌ－ドーパ濃度の低下は観察されず、そのことから再抽出もまたＬ－ドーパの安定性を増大させることが結論付けられ得る。

【００８２】

実施例９．Ｌ－ドーパの安定性

ｐＨ７．５（試料１）、ｐＨ６．５（試料２）、ｐＨ５．５（試料３）、及びｐＨ４．５（試料４）に調節された、実施例６に記載されたように製造された、Ｌ－ドーパが存在するところの発酵ブロスの試料が使用された。

【００８３】

試料１，２，３及び４は、室温において６００時間貯蔵され、（６００時間までの）時間の数点においてＬ－ドーパの濃度が測定された。Ｌ－ドーパ濃度はＨＰＬＣ分析により時間の関数として測定され（表４を参照のこと）、試料Ｄ、即ちｐＨ４．５における発酵ブロスは１０であった。

【００８４】

【表４】

表４：

| 時間[時] | ｐＨ７．５における発酵ブロス（試料１） | ｐＨ６．５における発酵ブロス（試料２） | ｐＨ５．５における発酵ブロス（試料３） | ｐＨ４．５における発酵ブロス（試料４） |
|---|---|---|---|---|
| 24 | 6 | 7 | 9 | 10 |
| 96 | 6 | 7 | 9 | 10 |
| 168 | 5 | 7 | 9 | 10 |
| 336 | 4 | 5 | 9 | 10 |
| 408 | 3 | 5 | 9 | 10 |
| 504 | 3 | 4 | 8 | 10 |
| 600 | 2 | 4 | 8 | 10 |

【００８５】

表４に示された結果は、発酵ブロスのより低いｐＨ値は、Ｌ－ドーパの安定性を増加させることを示す。

【配列表】

2005534328000001.app

【国際調査報告】

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/08507

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N9/02 C12P13/22

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12P C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ, MEDLINE, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category ° | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| X | DATABASE CA 'Online!<br>CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US;<br>NAKAYAMA, KIYOSHI ET AL: "Fermentative production of.beta.-(3,4-dihydroxyphenyl)-L-alanine"<br>retrieved from STN<br>Database accession no. 83:7116<br>XP002224427 | 1-3,5,<br>8-10 |
| Y | abstract<br>& JP 49 100290 A (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) 21 September 1974 (1974-09-21)<br>--- | 4,6,7 |
| Y | US 5 837 504 A (LEE JANG YOUNG ET AL)<br>17 November 1998 (1998-11-17)<br>the whole document<br>--- | 4,7 |
| | -/-- | |

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 10 November 2003 | 17/11/2003 |

| Name and mailing address of the ISA | Authorized officer |
|---|---|
| European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL – 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl,<br>Fax: (+31–70) 340–3016 | Piret, B |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/08507

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category ° | Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| Y | GERIGK M R ET AL: "Enhanced pilot-scale fed-batch L-phenylalanine production with recombinant Escherichia coli by fully integrated reactive extraction." BIOPROCESS AND BIOSYSTEMS ENGINEERING, vol. 25, no. 1, April 2002 (2002-04), pages 43-52, XP002224425 April, 2002 ISSN: 1615-7591 page 44, left-hand column, paragraph 4 page 47, left-hand column, paragraph 2 -right-hand column, paragraph 2 --- | 6 |
| A | XUN LUYING ET AL: "Characterization of 4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase (HpaB) of Escherichia coli as a reduced flavin adenine dinucleotide-utilizing monooxygenase." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY., vol. 66, no. 2, February 2000 (2000-02), pages 481-486, XP002224426 ISSN: 0099-2240 cited in the application the whole document --- | 7,8 |
| A | BONGAERTS J ET AL: "Metabolic engineering for microbial production of aromatic amino acids" METABOLIC ENGINEERING, ACADEMIC PRESS,, US, vol. 3, October 2001 (2001-10), pages 289-300, XP002195863 ISSN: 1096-7176 cited in the application --- | |
| A | US 3 928 431 A (BRODERMAN THORD ET AL) 23 December 1975 (1975-12-23) the whole document --- | |
| A | WO 95 33843 A (PURDUE RESEARCH FOUNDATION) 14 December 1995 (1995-12-14) page 7, last paragraph -page 11, paragraph 2 ----- | |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 03/08507

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | | Publication date |
|---|---|---|---|---|---|
| JP 49100290 | A | 21-09-1974 | JP | 868772 C | 30-06-1977 |
| | | | JP | 51045674 B | 04-12-1976 |
| US 5837504 | A | 17-11-1998 | NONE | | |
| US 3928431 | A | 23-12-1975 | FI | 48673 B | 02-09-1974 |
| | | | AT | 320140 B | 27-01-1975 |
| | | | CA | 996575 A1 | 07-09-1976 |
| | | | CH | 581095 A5 | 29-10-1976 |
| | | | DE | 2333375 A1 | 24-01-1974 |
| | | | DK | 140405 B | 20-08-1979 |
| | | | ES | 416750 A1 | 01-02-1976 |
| | | | FR | 2192846 A1 | 15-02-1974 |
| | | | GB | 1396235 A | 04-06-1975 |
| | | | NL | 7309698 A | 16-01-1974 |
| | | | NO | 139683 B | 15-01-1979 |
| | | | SE | 407743 B | 23-04-1979 |
| WO 9533843 | A | 14-12-1995 | US | 5776736 A | 07-07-1998 |
| | | | EP | 0763127 A1 | 19-03-1997 |
| | | | WO | 9533843 A1 | 14-12-1995 |

フロントページの続き

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

(72)発明者 クルメール，マルコ
ドイツ国，５２４２８ チューリッヒ，アドルフ フィッシャー シュトラッセ ２９
(72)発明者 クレメール－ミュフェン，スザンヌ
ドイツ国，５２４４１ リンニッヒ－ゲレオンスヴァイレル， エデレネルシュトラッセ ３２
(72)発明者 ウボルツ，マルセル，ゲルハルダス
オランダ国，６１３２ シーエックス シッタルド，フェリックス ルッテンラーン ７２

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 BA08 BA71 CA02 DA06 EA04 GA11 GA19 HA03
4B064 AE29 CA02 CA19 CA21 CC03 CC07 CC12 CC15 CC24 CD09
DA01