

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)公開番号

特開2023-74007

(P2023-74007A)

(43)公開日 令和5年5月26日(2023.5.26)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/60 (2006.01)	C 1 2 N 15/60	4 B 0 5 0
C 1 2 N 15/54 (2006.01)	C 1 2 N 15/54	Z N A 4 B 0 6 4
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z 4 B 0 6 5
C 1 2 N 9/10 (2006.01)	C 1 2 N 9/10	
C 1 2 N 9/88 (2006.01)	C 1 2 N 9/88	

審査請求 未請求 請求項の数 14 O L (全23頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2022-183717(P2022-183717)	(71)出願人 000000918 花王株式会社 東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番 10号
(22)出願日 令和4年11月16日(2022.11.16)	
(31)優先権主張番号 特願2021-186329(P2021-186329)	(74)代理人 110000084 弁理士法人アルガ特許事務所
(32)優先日 令和3年11月16日(2021.11.16)	(72)発明者 辻 幸盛 和歌山県和歌山市湊1334 花王株式 会社研究所内
(33)優先権主張国・地域又は機関 日本国(JP)	(72)発明者 野中 鏡士朗 和歌山県和歌山市湊1334 花王株式 会社研究所内
	(72)発明者 高橋 史員 和歌山県和歌山市湊1334 花王株式 会社研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ジヒドロキシフェニルアラニンの製造方法

(57)【要約】

【課題】微生物の培養菌体を用いてプロトカテク酸から3,4-ジヒドロキシフェニルアラニンを効率よく製造する方法を提供する。

【解決手段】プロトカテク酸デカルボキシラーゼ及びチロシンフェノールリアーゼを生産する微生物の培養菌体若しくはその破砕物又は当該微生物の菌体抽出物と、プロトカテク酸、ピルビン酸及びアンモニウム塩を接触反応させる工程を含む3,4-ジヒドロキシフェニルアラニンの製造方法。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

プロトカテク酸デカルボキシラーゼ及びチロシンフェノールリアーゼを生産する微生物の培養菌体若しくはその破砕物又は当該微生物の菌体抽出物と、プロトカテク酸、ピルビン酸及びアンモニウム塩を接触反応させる工程を含む 3, 4 - ジヒドロキシフェニルアラニンの製造方法。

## 【請求項 2】

微生物がプロトカテク酸デカルボキシラーゼ及びチロシンフェノールリアーゼをコードする遺伝子を有する、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 3】

微生物が、さらにフラビンモノヌクレオチドプレニルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を有する、請求項 2 記載の方法。

## 【請求項 4】

遺伝子のうち少なくとも 1 つが外来遺伝子である、請求項 2 又は 3 記載の方法。

## 【請求項 5】

チロシンフェノールリアーゼがプロトカテク酸による活性阻害率が 91% 以下のチロシンフェノールリアーゼである、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の方法。

## 【請求項 6】

チロシンフェノールリアーゼが、以下の (B1)、(B2)、(C1)、(C2)、(D1) 及び (D2) からなる群より選択されるタンパク質である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の方法。

(B1) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

(B2) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列と少なくとも 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつチロシンフェノールリアーゼ活性を有するタンパク質

(C1) 配列番号 4 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

(C2) 配列番号 4 に示すアミノ酸配列と少なくとも 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつチロシンフェノールリアーゼ活性を有するタンパク質

(D1) 配列番号 6 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

(D2) 配列番号 6 に示すアミノ酸配列と少なくとも 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつチロシンフェノールリアーゼ活性を有するタンパク質

## 【請求項 7】

チロシンフェノールリアーゼが、前記 (B1) 又は (B2) のタンパク質である、請求項 6 記載の方法。

## 【請求項 8】

プロトカテク酸が糖類を原料として製造されたものである、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項記載の方法。

## 【請求項 9】

反応溶液中より 3, 4 - ジヒドロキシフェニルアラニンを回収する工程を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項記載の方法。

## 【請求項 10】

プロトカテク酸デカルボキシラーゼ及びチロシンフェノールリアーゼをコードするポリヌクレオチドを含むベクター又は DNA 断片。

## 【請求項 11】

さらにフラビンモノヌクレオチドプレニルトランスフェラーゼをコードするポリヌクレオチドを含む、請求項 10 記載のベクター又は DNA 断片。

## 【請求項 12】

チロシンフェノールリアーゼが、以下の (B1)、(B2)、(C1)、(C2)、(D1) 及び (D2) からなる群より選択されるタンパク質である、請求項 10 又は 11 記載のベクター又は DNA 断片。

(B1) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

10

20

30

40

50

( B 2 ) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列と少なくとも 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつチロシンフェノールリアーゼ活性を有するタンパク質

( C 1 ) 配列番号 4 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

( C 2 ) 配列番号 4 に示すアミノ酸配列と少なくとも 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつチロシンフェノールリアーゼ活性を有するタンパク質

( D 1 ) 配列番号 6 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

( D 2 ) 配列番号 6 に示すアミノ酸配列と少なくとも 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつチロシンフェノールリアーゼ活性を有するタンパク質

【請求項 13】

請求項 9 ~ 12 のいずれか 1 項記載のベクター又は DNA 断片を含有する形質転換細胞 10

【請求項 14】

微生物が、請求項 13 記載の形質転換細胞である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ジヒドロキシフェニルアラニンの製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

3, 4 - ジヒドロキシ - L - フェニルアラニン ( L - D O P A ) は、ある種の植物 ( 例えばムクナマメ ) や哺乳類の体内で生合成される化合物である。哺乳類では非必須アミノ酸である L - チロシンがチロシン水酸化酵素により水酸化されて L - D O P A に変換され、さらに L - D O P A 脱炭酸酵素により神経伝達物質であるドーパミンに変換される。すなわち L - D O P A はドーパミンの前駆体である。また、L - D O P A は血液脳関門を通過できることから、パーキンソン病の治療薬としても用いられる。

【0003】

従来、L - D O P A の製造法として、バニリンを原料とする化学合成法や、微生物の有する酵素系を用いた方法等が知られ、安価且つ効率的な方法として、 - チロシナーゼ ( チロシンフェノールリアーゼ ) 活性を有するエルウィニア属微生物の培養物をカテコール、ピルビン酸及びアンモニウムイオン、又はカテコール及び L - セリンに接触反応させて製造する方法が報告されている ( 例えば、特許文献 1 ) 。

【0004】

一方、シキミ酸経路は、植物や微生物が芳香族化合物を生合成する重要な代謝経路である。シキミ酸経路では、炭素 6 員環の形成に続いて二重結合の形成が行われるが、3 - デヒドロシキミ酸から誘導されるプロトカテク酸からは、没食子酸、カテコール等の芳香族化合物が生産されることが知られている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献 1】特許第 3 1 1 6 1 0 2 号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、微生物の培養菌体等を用いてプロトカテク酸から 3, 4 - ジヒドロキシフェニルアラニンを効率よく製造する方法を提供することに関する。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、プロトカテク酸に阻害を受けにくいチロシンフェノールリアーゼを見出し、プロトカテク酸デカルボキシラーゼ及び該チロシンフェノールリアーゼを生産する微 50

生物の培養菌体を用いることにより、プロトカテク酸から 3, 4 - ジヒドロキシフェニルアラニンを効率良く製造できることを見出した。

【0008】

すなわち本発明は、以下の 1) ~ 3) に係るものである。

1) プロトカテク酸デカルボキシラーゼ及びチロシンフェノールリアーゼを生産する微生物の培養菌体若しくはその破砕物又は当該微生物の菌体抽出物と、プロトカテク酸、ピルビン酸及びアンモニウム塩を接触反応させる工程を含む 3, 4 - ジヒドロキシフェニルアラニンの製造方法。

2) プロトカテク酸デカルボキシラーゼ及びチロシンフェノールリアーゼをコードするポリヌクレオチドを含むベクター又は DNA 断片。

3) 上記 2) のベクター又は DNA 断片を含有する形質転換細胞。

【発明の効果】

【0009】

本発明によれば、プロトカテク酸から 3, 4 - ジヒドロキシフェニルアラニンを効率よく製造することが可能になる。プロトカテク酸はシキミ酸経路を介して生成されることから、本発明によれば、バイオマス糖を原料として 3, 4 - ジヒドロキシフェニルアラニンの生産が可能となる。

【発明を実施するための形態】

【0010】

本発明において、アミノ酸配列又はヌクレオチド配列の同一性は、Lipman - Pearson 法 (Science, 1985, 227: 1435-1441) によって計算される。具体的には、遺伝情報処理ソフトウェア GENEYX Ver. 1.2 のホモロジー解析 (Search homology) プログラムを用いて、Unit size to compare (ktup) を 2 として解析を行うことにより算出される。

【0011】

本発明において、アミノ酸配列及びヌクレオチド配列に関する「少なくとも 90% の同一性」とは、90% 以上、好ましくは 95% 以上、より好ましくは 96% 以上、さらに好ましくは 97% 以上、さらにより好ましくは 98% 以上、なお好ましくは 99% 以上の同一性をいう。

【0012】

本発明において、「1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換、付加、又は挿入されたアミノ酸配列」とは、1 個以上 20 個以下、好ましくは 1 個以上 15 個以下、より好ましくは 1 個以上 10 個以下、より好ましくは 1 個以上 5 個以下、さらにより好ましくは 1 個以上 3 個以下のアミノ酸が欠失、置換、付加、又は挿入されたアミノ酸配列をいう。また、「1 又は数個のヌクレオチドが欠失、置換、付加、又は挿入されたヌクレオチド配列」とは、1 個以上 30 個以下、好ましくは 1 個以上 24 個以下、より好ましくは 1 個以上 15 個以下、さらにより好ましくは 1 個以上 9 個以下のヌクレオチドが欠失、置換、付加、又は挿入されたヌクレオチド配列をいう。本発明において、アミノ酸又はヌクレオチドの「付加」には、配列の一末端及び両末端へのアミノ酸又はヌクレオチドの付加が含まれる。

斯かる欠失、置換、挿入、付加等の変異の導入は、例えば部位特異的な変異導入法等により、対象の塩基配列に変異を導入することにより実施できる。

【0013】

本発明において、遺伝子に関する「上流」及び「下流」とは、該遺伝子の転写方向の上流及び下流をいう。例えば、「プロモーターの下流に配置された遺伝子」とは、DNA センス鎖においてプロモーターの 3' 側に該遺伝子が存在することを意味し、遺伝子の上流とは、DNA センス鎖における該遺伝子の 5' 側の領域を意味する。

【0014】

本発明において、プロモーター等の制御領域と遺伝子の「作動可能な連結」とは、遺伝子と制御領域とが、該遺伝子が該制御領域の制御の下で発現し得るように連結されていることをいう。遺伝子と制御領域との「作動可能な連結」の手順は当業者に周知である。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 5 】

本発明において、「外来遺伝子」とは、細胞に外部から導入された外因性の遺伝子である。外来遺伝子は、それが導入された細胞と同種の生物由来であっても、異種の生物由来（すなわち異種遺伝子）であってもよい。

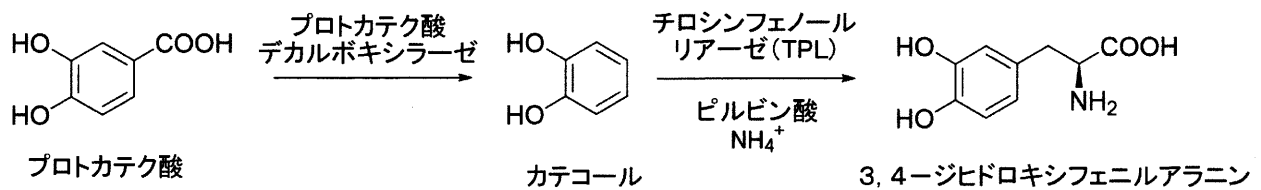
## 【 0 0 1 6 】

本発明の方法において、3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン(DOPA)は、プロトカテク酸デカルボキシラーゼ及びチロシンフェノールリアーゼを生産する微生物の培養菌体若しくはその破砕物又は当該微生物の菌体抽出物と、プロトカテク酸(PCA)、ピルビン酸及びアンモニウム塩を接触反応させることにより製造される。

当該反応は、下記式で示すように、プロトカテク酸がプロトカテク酸デカルボキシラーゼによってカテコールに変換された後、当該カテコールとピルビン酸及びアンモニウム塩がチロシンフェノールリアーゼ(TPL)によって反応して、3,4-ジヒドロキシフェニルアラニンを生成する反応である。

## 【 0 0 1 7 】

## 【 化 1 】



## 【 0 0 1 8 】

本発明において、3,4-ジヒドロキシフェニルアラニンは、3,4-ジヒドロキシ-L-フェニルアラニン(L-DOPA)及び3,4-ジヒドロキシ-D-フェニルアラニン(D-DOPA)を含むが、3,4-ジヒドロキシ-L-フェニルアラニン(L-DOPA)が好ましい。

## 【 0 0 1 9 】

本発明においてDOPAは、両性イオン又は塩の形態であっても良く、塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、塩酸塩、硫酸塩などを挙げることができる。これらの中でも、塩酸塩、硫酸塩がより好ましい。

## 【 0 0 2 0 】

本発明の微生物は、プロトカテク酸デカルボキシラーゼ及びチロシンフェノールリアーゼの生産能を有し、具体的にはプロトカテク酸デカルボキシラーゼ及びチロシンフェノールリアーゼをコードする遺伝子を有する微生物が挙げられる。

プロトカテク酸デカルボキシラーゼは、プロトカテク酸を脱炭酸してカテコールを生成する反応を触媒する酵素をいう。プロトカテク酸デカルボキシラーゼ活性を有する酵素としては、プロトカテク酸デカルボキシラーゼ(Protocatechuate decarboxylase、EC 4.1.1.63)、没食子酸デカルボキシラーゼ(Gallic acid decarboxylase、EC 4.1.1.59)、4-ヒドロキシ安息香酸デカルボキシラーゼ(4-hydroxybenzoate decarboxylase、EC 4.1.1.61)等が挙げられるが、プロトカテク酸デカルボキシラーゼ(EC 4.1.1.63)が好ましい。

プロトカテク酸デカルボキシラーゼとしては、例えば、以下の(A1)又は(A2)のタンパク質が挙げられる。

(A1) 配列番号18に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

(A2) 配列番号18に示すアミノ酸配列と少なくとも90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつプロトカテク酸デカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質

配列番号18のアミノ酸配列からなるタンパク質は、エンテロバクター・クロアカ(Enterobacter cloacae)由来のプロトカテク酸デカルボキシラーゼ(EcAroY)である。

## 【 0 0 2 1 】

( A 2 ) のタンパク質において、プロトカテク酸デカルボキシラーゼ活性の点から、配列番号 1 8 のアミノ酸配列との同一性は、9 5 % 以上であることが好ましく、より好ましくは 9 7 % 以上であり、9 8 % 以上がさらに好ましく、9 9 % 以上がよりさらに好ましい。

当該 ( A 2 ) のタンパク質のアミノ酸配列には、例えば配列番号 1 8 のアミノ酸配列において 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列が包含される。

また、当該タンパク質がプロトカテク酸デカルボキシラーゼ活性を有することは、例えば、タンパク質を基質 ( すなわちプロトカテク酸 ) とインキュベートし、当該タンパク質及び基質依存的なカテコールの生成を測定することにより、確認することができる。

10

## 【 0 0 2 2 】

プロトカテク酸デカルボキシラーゼ遺伝子としては、例えば、前記 ( A 1 ) 又は ( A 2 ) のタンパク質をコードする遺伝子が挙げられる。

具体的には、以下の ( a 1 ) 又は ( a 2 ) のポリヌクレオチドが挙げられる。

( a 1 ) 配列番号 1 7 に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド

( a 2 ) 配列番号 1 7 に示すヌクレオチド配列と少なくとも 9 0 % 以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、プロトカテク酸デカルボキシラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

ここで、配列番号 1 7 に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドは、エンテロバクター・クロアカ ( *Enterobacter cloacae* ) 由来プロトカテク酸デカルボキシラーゼ ( *EcAroY* ) をコードする遺伝子を示す。

20

( a 2 ) のヌクレオチドにおいて、プロトカテク酸デカルボキシラーゼ活性の点から、配列番号 1 7 のヌクレオチド配列との同一性は、9 5 % 以上であることが好ましく、より好ましくは 9 7 % 以上であり、9 8 % 以上がさらに好ましく、9 9 % 以上がよりさらに好ましい。

当該 ( a 2 ) のポリヌクレオチドのヌクレオチド配列には、例えば配列番号 1 7 で示されるヌクレオチド配列に対して 1 又は数個のヌクレオチドが欠失、置換、付加、又は挿入されたヌクレオチド配列が包含される。

## 【 0 0 2 3 】

本発明において、チロシンフェノールリアーゼ ( *Tyrosine phenol-lyase*、EC 4 . 1 . 9 9 . 2 ) は、L - チロシンをフェノール、ピルビン酸、アンモニアに分解する反応又はその逆反応を触媒する酵素である。また、チロシンフェノールリアーゼは、3 , 4 - ジヒドロキシフェニルアラニンを経由して、ピルビン酸、アンモニアに分解する反応又はその逆反応も触媒することが可能である。

チロシンフェノールリアーゼによるカテコールから 3 , 4 - ジヒドロキシフェニルアラニンへの変換反応を含む反応系において、チロシンフェノールリアーゼはカテコール又はその前駆体であるプロトカテク酸により、その活性が阻害されることが考えられる。

したがって、本発明において用いられるチロシンフェノールリアーゼとしては、プロトカテク酸による活性阻害率が低いものであるのが好ましく、例えば、後述する実施例 2 で示される条件 2 ~ 6 の何れかの条件において、下記式で算出される阻害率が 9 1 % 以下、好ましくは 9 0 % 以下、好ましくは 7 5 % 以下、より好ましくは 5 0 % 以下、より好ましくは 4 0 % 以下、さらに好ましくは 3 6 % 以下であるものが挙げられる。

40

## 【 0 0 2 4 】

( 数 1 )

チロシンフェノールリアーゼのプロトカテク酸による阻害率 ( % ) = 1 0 0 × [ 1 - { プロトカテク酸存在下におけるカテコールから 3 , 4 - ジヒドロキシフェニルアラニンへの変換率 ( % ) } ] / [ プロトカテク酸非存在下におけるカテコールから 3 , 4 - ジヒドロキシフェニルアラニンへの変換率 ( % ) ]

ここで、カテコールから 3 , 4 - ジヒドロキシフェニルアラニンへの変換率 ( % ) は、

50

$100 \times \left[ \text{反応終了時の} 3, 4\text{-ジヒドロキシフェニルアラニンの物質質量 (mol)} \right] /$   
 $\left[ \text{反応開始前のカテコールの物質質量 (mol)} \right]$ により算出される。

【0025】

本発明のチロシンフェノールリアーゼとしては、好適には、例えば以下の(B1)、(B2)、(C1)、(C2)、(D1)及び(D2)からなる群より選択されるタンパク質が挙げられる。

(B1) 配列番号2に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

(B2) 配列番号2に示すアミノ酸配列と少なくとも90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつチロシンフェノールリアーゼ活性を有するタンパク質

(C1) 配列番号4に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

(C2) 配列番号4に示すアミノ酸配列と少なくとも90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつチロシンフェノールリアーゼ活性を有するタンパク質

(D1) 配列番号6に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

(D2) 配列番号6に示すアミノ酸配列と少なくとも90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつチロシンフェノールリアーゼ活性を有するタンパク質

【0026】

配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質は、フソバクテリウム・ヌクレアタム(*Fusobacterium nucleatum*)由来のチロシンフェノールリアーゼ(FnTPL)である。

配列番号4のアミノ酸配列からなるタンパク質は、シトロバクタ・フレウンディー(*Citrobacter freundii*)由来のチロシンフェノールリアーゼ(CfTPL)である。

配列番号6のアミノ酸配列からなるタンパク質は、エルウィニア・ヘルビコラ(*Erwinia herbicola*)由来のチロシンフェノールリアーゼ(EwTPL)である。

【0027】

(B2)、(C2)又は(D2)のタンパク質において、チロシンフェノールリアーゼ活性の点から、それぞれ配列番号2、配列番号4又は配列番号6のアミノ酸配列との同一性は、95%以上であることが好ましく、より好ましくは97%以上であり、98%以上がさらに好ましく、99%以上がよりさらに好ましい。

当該(B2)、(C2)又は(D2)のタンパク質のアミノ酸配列には、例えば配列番号2、配列番号4又は配列番号6のアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、又は付加されたアミノ酸配列が包含される。

また、当該タンパク質がチロシンフェノールリアーゼ活性を有することは、例えば、タンパク質を基質(すなわちフェノール又はカテコール、ピルビン酸及びアンモニウム塩)とインキュベートし、当該タンパク質及び基質依存的なチロシン又は3,4-ジヒドロキシフェニルアラニンの生成を測定することにより、確認することができる。

【0028】

本発明のチロシンフェノールリアーゼ遺伝子としては、前記(B1)、(B2)、(C1)、(C2)、(D1)及び(D2)の各タンパク質をコードする遺伝子が挙げられる。

具体的には、以下の(b1)、(b2)、(c1)、(c2)、(d1)及び(d2)からなる群より選択されるポリヌクレオチドが挙げられる。

(b1) 配列番号1に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド

(b2) 配列番号1に示すヌクレオチド配列と少なくとも90%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、チロシンフェノールリアーゼ活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

(c1) 配列番号3に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド

(c2) 配列番号3に示すヌクレオチド配列と少なくとも90%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、チロシンフェノールリアーゼ活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

10

20

30

40

50

(d1) 配列番号5に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド

(d2) 配列番号5に示すヌクレオチド配列と少なくとも90%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、チロシンフェノールリアーゼ活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

【0029】

ここで、配列番号1に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドは、フソバクテリウム・ヌクレアタム(*Fusobacterium nucleatum*)由来のチロシンフェノールリアーゼ(*FnTPL*)をコードする遺伝子を示す。

配列番号3に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドは、シトロバクタ・フレウンディー(*Citrobacter freundii*)由来のチロシンフェノールリアーゼ(*CfTPL*)をコードする遺伝子を示す。

10

配列番号5に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドは、エルウィニア・ヘルビコラ(*Erwinia herbicola*)由来のチロシンフェノールリアーゼ(*EwTPL*)をコードする遺伝子を示す。

【0030】

(b2)、(c2)、(d2)のヌクレオチドにおいて、チロシンフェノールリアーゼ活性の点から、配列番号1、配列番号3及び配列番号5のそれぞれのヌクレオチド配列との同一性は、95%以上であることが好ましく、より好ましくは97%以上であり、98%以上がさらに好ましく、99%以上がよりさらに好ましい。

当該(b2)、(c2)又は(d2)のポリヌクレオチドのヌクレオチド配列には、例えば配列番号1、配列番号3又は配列番号5で示されるヌクレオチド配列に対して1又は複数個のヌクレオチドが欠失、置換、付加、又は挿入されたヌクレオチド配列が包含される。

20

【0031】

斯かるチロシンフェノールリアーゼをコードする遺伝子のうち、プロトカテク酸による活性阻害を受けにくく、3,4-ジヒドロキシフェニルアラニンの生産効率に優れる点で、フソバクテリウム・ヌクレアタム由来のチロシンフェノールリアーゼ(*FnTPL*)の遺伝子、具体的には、上記(B1)又は(B2)で示されるタンパク質をコードする遺伝子、さらに具体的には上記(b1)又は(b2)で示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドが好ましい。

30

【0032】

本発明の微生物は、プロトカテク酸によるチロシンフェノールリアーゼの活性阻害を抑制する点から、さらにフラビンモノヌクレオチドプレニルトランスフェラーゼ生産能を有するもの、すなわちフラビンモノヌクレオチドプレニルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を有するのが好ましい。

フラビンモノヌクレオチドプレニルトランスフェラーゼ(*Flavin prenyl transferase*、EC 2.5.1.129)は、ジメチルアリルリン酸(*DMAP*)からジメチルアリル構造をフラビンモノヌクレオチド(*FMN*)のフラビン骨格へと結合し、*prenylated-FMN*を合成する反応を触媒する酵素である。

本発明のフラビンモノヌクレオチドプレニルトランスフェラーゼとしては、例えば、以下の(E1)又は(E2)のタンパク質が挙げられる。

40

(E1) 配列番号24に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

(E2) 配列番号24に示すアミノ酸配列と少なくとも90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつフラビンモノヌクレオチドプレニルトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質

配列番号24のアミノ酸配列からなるタンパク質は、大腸菌由来フラビンモノヌクレオチドプレニルトランスフェラーゼ(*EcUbiX*)である。

【0033】

(E2)のタンパク質において、フラビンモノヌクレオチドプレニルトランスフェラーゼ活性の点から、配列番号24のアミノ酸配列との同一性は、95%以上であることが好

50

ましく、より好ましくは97%以上であり、98%以上がさらに好ましく、99%以上がよりさらに好ましい。

当該(E2)のタンパク質のアミノ酸配列には、例えば配列番号24のアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列が包含される。

また、当該タンパク質がフラビンモノヌクレオチドプレニルトランスフェラーゼ活性を有することは、例えば、Nature, 2015, 522:502-506等を参照でき、タンパク質をフラビンモノヌクレオチド(FMN)及びジメチルアリルーリン酸(DMAP)の存在下でインキュベートし、prenylated-FMNの生成による吸収スペクトル変化を追跡することにより、確認することができる。

10

#### 【0034】

本発明のフラビンモノヌクレオチドプレニルトランスフェラーゼ遺伝子としては、前記(E1)又は(E2)のタンパク質をコードする遺伝子が挙げられる。

具体的には、下記(e1)又は(e2)のポリヌクレオチドが挙げられる。

(e1)配列番号23に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド

(e2)配列番号23に示すヌクレオチド配列と少なくとも90%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、フラビンモノヌクレオチドプレニルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

ここで、配列番号23に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドは、大腸菌由来フラビンモノヌクレオチドプレニルトランスフェラーゼ(EcUbiX)をコードする遺伝子を示す。

20

(e2)のヌクレオチドにおいて、フラビンモノヌクレオチドプレニルトランスフェラーゼ活性の点から、配列番号23のヌクレオチド配列との同一性は、95%以上であることが好ましく、より好ましくは97%以上であり、98%以上がさらに好ましく、99%以上がよりさらに好ましい。

当該(e2)のポリヌクレオチドのヌクレオチド配列には、例えば配列番号23で示されるヌクレオチド配列に対して1又は数個のヌクレオチドが欠失、置換、付加、又は挿入されたヌクレオチド配列が包含される。

#### 【0035】

本発明の微生物は、前記プロトカテク酸デカルボキシラーゼ及びチロシンフェノールリアーゼ、所望によりさらにフラビンモノヌクレオチドプレニルトランスフェラーゼをコードする遺伝子(これらを「本発明の遺伝子」とも称する)を有すればよいが、少なくとも1つが宿主微生物に対して外因性の遺伝子(外来遺伝子)であるのが好ましい。

30

外来遺伝子が導入された微生物は、当該遺伝子を宿主細胞中で発現させることのできる発現ベクターや遺伝子発現カセットを調製し、これを宿主細胞に導入して宿主細胞を形質転換させることにより作製できる。

#### 【0036】

形質転換体の宿主としての微生物は原核生物、真核生物のいずれであってもよく、エシェリキア(Escherichia)属に属する微生物やバシラス(Bacillus)属に属する微生物、放線菌、コリネ型細菌等の原核生物、又は酵母や糸状菌等の真核微生物を用いることができる。なかでも、エシェリキア属に属する微生物である大腸菌(Escherichia coli)、エルウィニア属に属する微生物であるエルウィニア・ヘルビコラ(Erwinia herbicola)、バシラス属に属する微生物である枯草菌(Bacillus subtilis)、コリネバクテリウム属に属する微生物であるコリネバクテリウム・グルタミカム(Corynebacterium glutamicum)、シュードモナス属に属する微生物であるシュードモナス・プチダ(Pseudomonas putida)、ロドコッカス属に属する微生物であるロドコッカス・ジョスティ(Rhodococcus jostii)が好ましく、大腸菌又はコリネバクテリウム・グルタミカムがより好ましい。

40

#### 【0037】

50

発現ベクターの母体となるベクターとしては、本発明の遺伝子を宿主に導入することができ、宿主細胞内で当該遺伝子を発現可能なベクターであればよい。好ましくは、該ベクターは、本発明の遺伝子、及びこれと作動可能に連結された制御領域を含む。該ベクターは、プラスミド等の染色体外で自立増殖及び複製可能なベクターであってもよく、又は染色体内に組み込まれるベクターであってもよい。

具体的なベクターとしては、例えば pBluescript IISK(-) (アジレント・テクノロジー社)、pUC18/19、pUC118/119等のpUC系ベクター (タカラバイオ社)、pET系ベクター (メルク社)、pGEX系ベクター (メルク社)、pCold系ベクター (タカラバイオ社)、pHY300PLK (タカラバイオ社)、pUB110 (Mckenzie, T. et al., 1986, Plasmid 15 (2) : 93 - 103)、pBR322 (タカラバイオ社)、pMW218/219 (ニッポンジーン社)、pRI909/910等のpRI系ベクター (タカラバイオ社)、pBI系ベクター (クロンテック社)、IN3系ベクター (インプラントイノベーションズ社)、pPTR1/2 (タカラバイオ社)、pDJB2 (D. J. Ballance et al., Gene, 36, 321 - 331, 1985)、pAB4-1 (van Hartingsveldt Wet al., Mol Gen Genet, 206, 71 - 75, 1987)、pLeu4 (M. I. G. Roncero et al., Gene, 84, 335 - 343, 1989)、pPyr225 (C. D. Skory et al., Mol Genet Genomics, 268, 397 - 406, 2002)、pFG1 (Gruber, F. et al., Curr Genet, 18, 447 - 451, 1990)等が挙げられる。特に、宿主が大腸菌の場合は、pET系ベクターが好ましく用いられる。

#### 【0038】

また、本発明の遺伝子はこれを含むDNA断片として構築されていてもよい。該DNA断片としては、例えば、PCR増幅DNA断片及び制限酵素切断DNA断片が挙げられる。好ましくは、該DNA断片は、本発明の遺伝子、及びこれと作動可能に連結された制御領域を含む発現カセットであり得る。

#### 【0039】

上記ベクター又はDNA断片に含まれる制御領域は、該ベクター又はDNA断片が導入された宿主細胞内で本発明の遺伝子を発現させるための配列であり、例えばプロモーターやターミネーター等の発現調節領域、複製開始点等が挙げられる。該制御領域の種類は、ベクター又はDNA断片を導入する宿主微生物の種類に応じて適宜選択することができる。必要に応じて、該ベクター又はDNA断片はさらに、抗生物質耐性遺伝子、アミノ酸合成関連遺伝子等の選択マーカー (例えば、アンピシリン、ネオマイシン、カナマイシン、クロラムフェニコールなどの薬剤の耐性遺伝子) を有していてもよい。

本発明の遺伝子と上記制御領域や、マーカー遺伝子配列との連結は、シームレスクロニング法などの方法によって行うことができる。ベクターへの遺伝子配列の導入手順は、当該分野で周知である。プロモーター領域、ターミネーター、分泌シグナル領域等の制御領域の種類は、特に限定されず、導入する宿主に応じて、通常使用されるプロモーターや分泌シグナル配列を適宜選択して用いることができる。

#### 【0040】

該制御領域の好適な例としては、野生型に比較して発現を強化できる強制御領域、例えば公知の高発現プロモーターであるT7プロモーター、lacプロモーター、tacプロモーター、trpプロモーター、gapプロモーター、tufプロモーター等が例示されるが、これらに特に限定されない。

#### 【0041】

本発明の遺伝子を含むベクターを宿主へ導入するか、又は本発明の遺伝子を含むDNA断片を宿主のゲノムに導入することにより、形質転換細胞を得ることができる。

宿主へのベクター又はDNA断片の導入の方法としては、例えばヒートショック法、エレクトロポレーション法、トランスフォーメーション法、トランスフェクション法、接合

10

20

30

40

50

法、プロトプラスト法、パーティクル・ガン法、アグロバクテリウム法等を用いることができる。

#### 【0042】

また、本発明の遺伝子を宿主のゲノムに導入する方法としては、特に限定されないが、例えば、該遺伝子を含むDNA断片を用いた2重交差法が挙げられる。該DNA断片は、上述する宿主細胞において発現量の多い遺伝子のプロモーター配列の下流に導入されてもよく、あるいは、予め該DNA断片と上述した制御領域とを作動可能に連結した断片を作製し、当該連結断片を宿主のゲノムに導入してもよい。さらに、該DNA断片は、本発明の遺伝子が適切に導入された細胞を選択するためのマーカー（薬剤耐性遺伝子や栄養要求性相補遺伝子など）と予め連結されていてもよい。

10

#### 【0043】

目的のベクター又はDNA断片が導入された形質転換細胞は、選択マーカーを利用して選択することができる。例えば、選択マーカーが抗生物質耐性遺伝子である場合、該抗生物質添加培地で培養することで、目的のベクター又はDNA断片が導入された形質転換細胞を選択することができる。また例えば、選択マーカーがアミノ酸合成関連遺伝子である場合、該アミノ酸要求性の宿主微生物に遺伝子導入した後、該アミノ酸要求性の有無を指標に、目的のベクター又はDNA断片が導入された形質転換細胞を選択することができる。あるいは、PCR等によって形質転換細胞のDNA配列を調べることで目的のベクター又はDNA断片の導入を確認することもできる。

#### 【0044】

本発明の3,4-ジヒドロキシフェニルアラニンの製造においては、斯くして得られた微生物の培養菌体若しくはその破砕物又は当該微生物の菌体抽出物と、プロトカテク酸、ピルビン酸及びアンモニウム塩が接触反応に供されるが、ここで用いられる微生物の培養菌体は、培養中及び後の微生物培養液、微生物の培養物より分離された菌体、該培養菌体を凍結乾燥やスプレードライによって粉末にした粉末菌体、該培養菌体を担体に固定化した固定化菌体を挙げることができる。菌体破砕物としては、例えば本発明のプロトカテク酸デカルボキシラーゼ及びチロシンフェノールリアーゼを含む菌体破砕液やマイクロソーム画分等が挙げられる。また、当該微生物の菌体抽出物としては、当該微生物菌体をバクテリオファージ、有機溶媒や界面活性剤等の薬剤、酵素、機械的な力、温度ショック及び浸透圧ショック等によって溶菌させ、本発明のプロトカテク酸デカルボキシラーゼ及びチロ

20

30

#### 【0045】

微生物の培養は、炭素源、窒素源、無機塩類、その他の栄養物質を含有する培地（天然培地、合成培地）を用いて行うことができる。

ここで、炭素源としては、グルコース、フルクトース、マンノース、アラビノース、キシロース、ガラクトース等の単糖類；セロビオース、スクロース(ショ糖)、ラクトース、マルトース、トレハロース、セロビオース、キシロビオース等の二糖類；デキストリン又は可溶性澱粉等の多糖類等が挙げられる。また、糖類の他に、マンニトール、ソルビトール、キシリトール、グリセリンのような糖アルコール；酢酸、クエン酸、乳酸、フマル酸、マレイン酸、グルコン酸のような有機酸；エタノール、プロパノールのようなアルコール；ノルマルパラフィンのような炭化水素等も用いることができる。

40

窒素源としては、例えば、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕アルカリ抽出物、コーンステープリカー、メチルアミン等のアルキルアミン類、アミノ酸等の含窒素有機化合物、アンモニアもしくはその塩（塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、酢酸アンモニウムのような無機又は有機アンモニウム化合物）、尿素、アンモニア水、硝酸ナトリウム、硝酸カリウム等を使用することができる。無機塩類としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硝酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸亜鉛、硫酸コバルト、炭酸カルシウム等が挙げられる。

その他の栄養物質としては、大豆蛋白加水分解物、アミノ酸類等が挙げられる。

50

なお、培地には、チロシン又はチロシン代替物質、ビタミン B 6 類、カテコール、3, 4 - ジヒドロキシフェニルアラニン、プロトカテク酸、消泡剤等を添加することができる。

【 0 0 4 6 】

培養条件としては、培養温度は 15 ~ 45 が適当である。培養 pH 及び培養時間については特に限定されないが、例えば、pH を 6 . 0 ~ 8 . 0 に制御しつつ 6 ~ 7 2 時間培養を続ける方法が採用できる。また、培養中は必要に応じてアンピシリンやカナマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【 0 0 4 7 】

上記微生物の培養菌体若しくはその破砕物又は当該微生物の菌体抽出物と、プロトカテク酸、ピルビン酸及びアンモニウム塩との接触反応は、これらを混合し、通常 20 ~ 50 で、所定時間（例えば、30分~60時間、好ましくは1時間~24時間）、必要に応じ攪拌又は振とうしながら行うことができる。

【 0 0 4 8 】

ここで、原料として用いるプロトカテク酸の由来は特に限定されず、有機合成法及び微生物や酵素を用いる方法の何れにより生産されたものでも良いが、プロトカテク酸生産能を有する微生物を用いて、炭素源であるグルコース等の糖類から生産されたものが好ましい。

アンモニウム塩としては、酢酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、有機酸アンモニウム塩等を用いることができるが、硫酸アンモニウムを用いるのが好ましい。

【 0 0 4 9 】

プロトカテク酸の濃度は、0 . 5 ~ 100 g / L が好ましく、より好ましくは 5 ~ 15 g / L である。

ピルビン酸の濃度は、0 . 5 ~ 100 g / L が好ましく、より好ましくは 5 ~ 15 g / L である。

アンモニウム塩の濃度は、5 ~ 150 g / L が好ましく、より好ましくは 50 ~ 80 g / L である。

培養菌体若しくはその破砕物又は当該微生物の菌体抽出物の濃度は、2 ~ 400 g / L の範囲が適当であり、好ましくは 50 ~ 200 g / L である。

プロトカテク酸、ピルビン酸、及びアンモニウム塩を、反応溶液中に断続的に添加することによって、3, 4 - ジヒドロキシフェニルアラニンを蓄積させることができる。

【 0 0 5 0 】

また、反応系には必要に応じ亜硫酸ナトリウム、アスコルビン酸ナトリウムやシステイン等の還元剤、EDTA やクエン酸等のキレート剤、ピリドキサルリン酸等のビタミン B 6 類、Tris / HCl 等の緩衝液を添加してもよい。

還元剤の濃度は、0 . 5 ~ 20 g / L が好ましく、より好ましくは 2 ~ 5 g / L である。

キレート剤の濃度は、0 . 5 ~ 20 g / L が好ましく、より好ましくは 2 ~ 5 g / L である。

ピリドキサルリン酸の濃度は、0 . 05 ~ 5 mM が好ましく、より好ましくは 0 . 5 ~ 2 mM である。

緩衝液の濃度は、5 ~ 200 mM が好ましく、より好ましくは 50 ~ 100 mM である。

【 0 0 5 1 】

反応温度は、5 ~ 60 が好ましく、より好ましくは 15 ~ 30 である。

反応 pH は 5 . 0 ~ 10 . 0 の範囲が適当であり、好ましくは 6 . 5 ~ 8 . 5 である。反応時間は、用いるプロトカテク酸デカルボキシラーゼ及びチロシンフェノールリアーゼの活性量や基質濃度に応じ適宜決定されるが、通常 0 . 5 ~ 7 2 時間であり、好ましくは 6 時間 ~ 2 4 時間である。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 2 】

反応終了後、反応液中に生成した 3, 4 - ジヒドロキシフェニルアラニン は菌体を遠心分離やろ過等によって分離・回収した後、適宜イオン交換樹脂処理法、晶析法等の通常の方法を組み合わせることによりさらに精製することができる。

## 【 0 0 5 3 】

上述した実施形態に関し、本発明においてはさらに以下の態様が開示される。

< 1 > プロトカテク酸デカルボキシラーゼ及びチロシンフェノールリアーゼを生産する微生物の培養菌体若しくはその破砕物又は当該微生物の菌体抽出物と、プロトカテク酸、ピルビン酸及びアンモニウム塩を接触反応させる工程を含む 3, 4 - ジヒドロキシフェニルアラニンの製造方法。

10

< 2 > 微生物がプロトカテク酸デカルボキシラーゼ及びチロシンフェノールリアーゼをコードする遺伝子を有する、< 1 > の方法。

< 3 > 微生物が、さらにフラビンモノヌクレオチドプレニルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を有する、< 2 > の方法。

< 4 > 遺伝子のうち少なくとも 1 つが外来遺伝子である、< 2 > 又は < 3 > の方法。

< 5 > チロシンフェノールリアーゼがプロトカテク酸による活性阻害率が 91% 以下、好ましくは 75% 以下、より好ましくは 50% 以下、より好ましくは 40% 以下、さらに好ましくは 36% 以下のチロシンフェノールリアーゼである、< 1 > ~ < 4 > のいずれかの方法。

< 6 > チロシンフェノールリアーゼが、以下の ( B 1 )、( B 2 )、( C 1 )、( C 2 )、( D 1 ) 及び ( D 2 ) からなる群より選択されるタンパク質である、< 1 > ~ < 5 > のいずれかの方法。

20

( B 1 ) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

( B 2 ) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列と少なくとも 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつチロシンフェノールリアーゼ活性を有するタンパク質

( C 1 ) 配列番号 4 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

( C 2 ) 配列番号 4 に示すアミノ酸配列と少なくとも 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつチロシンフェノールリアーゼ活性を有するタンパク質

( D 1 ) 配列番号 6 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

( D 2 ) 配列番号 6 に示すアミノ酸配列と少なくとも 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつチロシンフェノールリアーゼ活性を有するタンパク質

30

< 7 > チロシンフェノールリアーゼが、前記 ( B 1 ) 又は ( B 2 ) のタンパク質である、< 6 > の方法。

< 8 > プロトカテク酸デカルボキシラーゼが、以下の ( A 1 ) 又は ( A 2 ) のタンパク質である、< 1 > ~ < 7 > のいずれかの方法。

( A 1 ) 配列番号 18 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

( A 2 ) 配列番号 18 に示すアミノ酸配列と少なくとも 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつプロトカテク酸デカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質

< 9 > フラビンモノヌクレオチドプレニルトランスフェラーゼが、以下の ( E 1 ) 又は ( E 2 ) のタンパク質である、< 3 > ~ < 8 > のいずれかの方法。

40

( E 1 ) 配列番号 24 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

( E 2 ) 配列番号 24 に示すアミノ酸配列と少なくとも 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつフラビンモノヌクレオチドプレニルトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質

< 10 > プロトカテク酸が糖類を原料として製造されたものである、< 1 > ~ < 9 > のいずれかの方法。

< 11 > 反応溶液中より 3, 4 - ジヒドロキシフェニルアラニンを回収する工程を含む、< 1 > ~ < 10 > のいずれかの方法。

< 12 > プロトカテク酸デカルボキシラーゼ及びチロシンフェノールリアーゼをコードするポリヌクレオチドを含むベクター又は DNA 断片。

50

< 1 3 > さらにフラビンモノヌクレオチドプレニルトランスフェラーゼをコードするポリヌクレオチドを含む、< 1 2 > のベクター又はDNA断片。

< 1 4 > チロシンフェノールリアーゼが、以下の ( B 1 )、( B 2 )、( C 1 )、( C 2 )、( D 1 ) 及び ( D 2 ) からなる群より選択されるタンパク質である、< 1 2 > 又は < 1 3 > のベクター又はDNA断片。

( B 1 ) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

( B 2 ) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつチロシンフェノールリアーゼ活性を有するタンパク質

( C 1 ) 配列番号 4 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

( C 2 ) 配列番号 4 に示すアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつチロシンフェノールリアーゼ活性を有するタンパク質 10

( D 1 ) 配列番号 6 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

( D 2 ) 配列番号 6 に示すアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつチロシンフェノールリアーゼ活性を有するタンパク質

< 1 5 > プロトカテク酸デカルボキシラーゼが、以下の ( A 1 ) 又は ( A 2 ) のタンパク質である、< 1 2 > ~ < 1 4 > のいずれかのベクター又はDNA断片。

( A 1 ) 配列番号 1 8 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

( A 2 ) 配列番号 1 8 に示すアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつプロトカテク酸デカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質

< 1 6 > フラビンモノヌクレオチドプレニルトランスフェラーゼが、以下の ( E 1 ) 又は ( E 2 ) のタンパク質である、< 1 3 > ~ < 1 5 > のいずれかのベクター又はDNA断片。 20

( E 1 ) 配列番号 2 4 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

( E 2 ) 配列番号 2 4 に示すアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつフラビンモノヌクレオチドプレニルトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質

< 1 7 > < 1 2 > ~ < 1 6 > のいずれかのベクター又はDNA断片を含有する形質転換細胞。

< 1 8 > 微生物が、< 1 7 > の形質転換細胞である、< 1 > ~ < 1 1 > のいずれかの方法。 30

#### 【実施例】

#### 【0054】

実施例 1 各種遺伝子を含むプラスミドの作製

以下の実施例において、PCRはKOD One PCR Master Mix (東洋紡社)を用いて行った。

(1)チロシンフェノールリアーゼをコードする遺伝子を含むプラスミド ( p E T \_ F n T P L、p E T \_ C f T P L、p E T \_ E w T P L ) の作製

フソバクテリウム・ヌクレアタム ( F u s o b a c t e r i u m n u c l e a t u m ) 由来のチロシンフェノールリアーゼ ( F n T P L ) をコードする遺伝子のDNA断片 (配列番号 1)、シトロバクテリウム・フレウンディー ( C i t r o b a c t e r f r e u n d i i ) 由来のチロシンフェノールリアーゼ ( C f T P L ) をコードする遺伝子のDNA断片 (配列番号 3)、及びエルウィニア・ヘルビコラ ( E r w i n i a h e r b i c o l a ) 由来のチロシンフェノールリアーゼ ( E w T P L ) をコードする遺伝子のDNA断片 (配列番号 5) を人工遺伝子合成 (ユーロフィンゲノミクス社) により作製し、これを鋳型として表 1 に示す各プライマーを用いた PCR にてインサート用 DNA 断片を得た。続いてプライマー p E T v e c F (配列番号 1 3、C A C C A C C A C C A C C A C C A C T G A G ) 及び p E T v e c R (配列番号 1 4、A T G T A T A T C T C C T T C T T A A A G T T A A A C A A A A T T A T T T C T A G A G G ) を用いて p E T 2 1 a プラスミドを鋳型とした PCR にてベクター用 DNA 断片を得た。これらの PCR 産物に対して D p n I (タカラバイオ社) による処理を行った後、各 DNA 断片を N u c l e o S p i n G e l a n d P C R c l e a n - u p (タカラバイオ 40

50

オ社)により精製した。精製後のDNA断片をIn-Fusion HD Cloning Kit(タカラバイオ社)により連結することで各プラスミド(pET\_FnTPL、pET\_CfTPL、pET\_EwTPL)を構築した。得られたプラスミド溶液を用いてECOS competent E. coli DH5(ニッポン・ジーン社)に形質転換し、細胞液をLB Amp寒天培地(Bacto Tryptone 1%、Yeast Extract 0.5%、NaCl 1%、アンピシリンナトリウム 50 µg/mL、寒天 1.5%)に塗布した後37℃にて一晩静置し、得られたコロニーに対しプライマーpET\_CPCR1\_F(配列番号15、CGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTG)及びpET\_CPCR1\_R(配列番号16、CCAAGGGGTTATGCTAGTTATTGCTCAG)を用いたPCR反応を行い、目的DNA断片の導入が確認された形質転換株を選択した。得られた形質転換株をLB Amp液体培地(Bacto Tryptone 1%、Yeast Extract 0.5%、NaCl 1%、アンピシリンナトリウム 50 µg/mL)2 mLに接種した後37℃で終夜培養した。この培養液よりNucleoSpin Plasmid Easy Pure(タカラバイオ社)を用いてプラスミドを精製した。

10

【0055】

【表1】

プライマー	配列 (5' → 3')	配列番号
FnTPL ins F	GAAGGAGATATACATATGAGGTTTCGAGGACTATCCAGC	7
FnTPL ins R	GTGGTGGTGGTGGTGTACTTCTTAATCCCAAAGC	8
CfTPL ins F	GAAGGAGATATACATATGAATTATCCGGCAGAACC	9
CfTPL ins R	GTGGTGGTGGTGGTGTAAATGTAGTCGAACCTCGC	10
EwTPL ins F	GAAGGAGATATACATATGAATTATCCGGCAGAG	11
EwTPL ins R	GTGGTGGTGGTGGTGTAAATGAAATCAAACCTTG	12

20

30

【0056】

(2)チロシンフェノールリアーゼ、プロトカテク酸デカルボキシラーゼ及びフラビンモノクレオチドプレニルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を含むプラスミドの作製

(a)プロトカテク酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子を含むプラスミド(pET\_EcAroY)の作製

エンテロバクター・クロアカ(Enterobacter cloacae)由来プロトカテク酸デカルボキシラーゼ(EcAroY)をコードする遺伝子のDNA断片(配列番号17)を人工遺伝子合成(ユーロフィンゲノミクス社)により作製した。これを鋳型としてプライマーEcAroY ins F(配列番号19、GAAGGAGATATACATATGCAAAACCCGATAAATGAC)及びEcAroY ins R(配列番号20、GTGGTGGTGGTGGTGTATTCTTATCGCTAAATAACTC)を用いたPCRにてインサート用DNA断片を得た。続いてプライマーpET\_vec F(配列番号13)及びpET\_vec R(配列番号14)を用いてpET21aプラスミドを鋳型としたPCRにてベクター用DNA断片を得た。これらのPCR産物に対してDpnI(タカラバイオ社)による処理を行った後、各DNA断片をNucleoSpin Gel and PCR clean-up(タカラバイオ社)により精製した。精製後のDNA断片をIn-Fusion HD Cloning Kit(タカラバイオ社)により連結することでプラスミド(pET\_EcAroY)を構築した。得られたプラスミド溶液を用いてECOS competent E. coli DH5(ニッポン・ジーン社)に形質転換し、細胞液を

40

50

L B A m p 寒天培地に塗布した後 37 にて一晚静置し、得られたコロニーに対しプライマー p E T C P C R 2 F (配列番号 2 1、AGATCTCGATCCCGCGAAAT) 及び p E T C P C R 2 R (配列番号 2 2、TTAGAGGCCCAAGGGGTT) を用いた P C R 反応を行い、目的 D N A 断片の導入が確認された形質転換株を選択した。得られた形質転換株を L B A m p 液体培地 2 m L に接種した後 37 で終夜培養した。この培養液より N u c l e o S p i n P l a s m i d E a s y P u r e (タカラバイオ社) を用いてプラスミドを精製した。

【0057】

(b) プロトカテク酸デカルボキシラーゼ及びフラビンモノヌクレオチドプレニルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を含むプラスミド (p E T \_ E c A r o Y - E c U b i X ) の作製 10

大腸菌由来フラビンモノヌクレオチドプレニルトランスフェラーゼ (E c U b i X ) をコードする遺伝子の D N A 断片 (配列番号 2 3 ) を人工遺伝子合成 (ユーロフィンゲノミクス社) により作製した。これを鋳型としてプライマー E c U b i X i n s F (配列番号 2 5、AAGGAGGTTTGATTCATGAAACGGCTTATTGTGGGCATTT) 及び E c U b i X i n s R (配列番号 2 6、GTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTAAAGCACCTTGCCACCGGGCA) を用いた P C R にてインサート用 D N A 断片を得た。(a) にて作製したプラスミド (p E T \_ E c A r o Y ) に対して、プライマー E c A r o Y v e c R (配列番号 2 7、GAATCAAACCTCCTTTATTTCTTATCGCTAAATAACTCTG) 及び E c A r o Y v e c F (配列番号 2 8、CACCAACCACCACTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCC) を用いた P C R にてベクター用 D N A 断片を得た。これらの P C R 産物に対して D p n I (タカラバイオ社) による処理を行った後、各 D N A 断片を N u c l e o S p i n G e l a n d P C R c l e a n - u p (タカラバイオ社) により精製した。精製後の D N A 断片を I n - F u s i o n H D C l o n i n g K i t (タカラバイオ社) により連結することで目的とするプラスミド (p E T \_ E c A r o Y - E c U b i X ) を構築した。得られたプラスミド溶液を用いて E C O S c o m p e t e n t E . c o l i D H 5 (ニッポン・ジーン社) に形質転換し、細胞液を L B A m p 寒天培地に塗布した後 37 にて一晚静置し、得られたコロニーに対しプライマー p E T C P C R 2 F (配列番号 2 1) 及び p E T C P C R 2 R (配列番号 2 2) を用いた P C R 反応を行い、目的 D N A 断片の導入が確認された形質転換株を選択した。得られた形質転換株を L B A m p 液体培地 2 m L に接種した後 37 で終夜培養した。この培養液より N u c l e o S p i n P l a s m i d E a s y P u r e (タカラバイオ社) を用いてプラスミドを精製した。 20 30

【0058】

(c) チロシンフェノールリアーゼ、プロトカテク酸デカルボキシラーゼ及びフラビンモノヌクレオチドプレニルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を含むプラスミドの作製

(1) にて作製した各プラスミド (p E T \_ F n T P L、p E T \_ C f T P L、p E T \_ E w T P L) を鋳型として表 2 に示す各プライマーを用いた P C R にてインサート用 D N A 断片を得た。続いて、(b) にて作製したプラスミド (p E T \_ E c A r o Y - E c U b i X ) を鋳型としてプライマー E c A r o Y - E c U b i X v e c F (配列番号 3 5、AGGAGGTTTGATTCATGCAAAACCCGATAAATGAC) 及び E c A r o Y - E c U b i X v e c R (配列番号 3 6、ATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAA) を用いて P C R にてベクター用 D 40

N A 断片を得た。これらの P C R 産物に対して D p n I (タカラバイオ社) による処理を行った後、各 D N A 断片を N u c l e o S p i n G e l a n d P C R c l e a n - u p (タカラバイオ社) により精製した。精製後の D N A 断片を I n - F u s i o n H D C l o n i n g K i t (タカラバイオ社) により連結することで目的とするプラスミド (p E T \_ F n T P L - E c A r o Y - E c U b i X、p E T \_ C f T P L - E c A r o Y - E c U b i X、p E T \_ E w T P L - E c A r o Y - E c U b i X) を構築した。得ら 50

れたプラスミド溶液を用いて ECOS competent E. coli DH5 (ニッポン・ジーン社) に形質転換し、細胞液を LB Amp 寒天培地に塗布した後 37 にて一晩静置し、得られたコロニーに対しプライマー pET\_CPCR2\_F (配列番号 20) 及び pET\_CPCR2\_R (配列番号 21) を用いた PCR 反応を行い、目的 DNA 断片の導入が確認された形質転換株を選択した。得られた形質転換株を LB Amp 液体培地 2 mL に接種した後 37 で終夜培養した。この培養液より NucleoSpin Plasmid Easy Pure (タカラバイオ社) を用いてプラスミドを精製した。

【0059】

【表 2】

プライマー	配列 (5' → 3')	配列番号
FnTPL2 insF	GAAGGAGATATACATATGAGGTTTCGAGGACTATCC	29
FnTPL2 insR	TGAATCAAACCTCCTTTACTTCTTAATCCCAAAGC	30
CfTPL2 insF	GAAGGAGATATACATATGAATTATCCGGCAGAACC	31
CfTPL2 insR	TGAATCAAACCTCCTTTAAATGTAGTCGAACCTCG	32
EwTPL2 insF	GAAGGAGATATACATATGAATTATCCGGCAGAGCC	33
EwTPL2 insR	TGAATCAAACCTCCTTTAAATGAAATCAAACCTTG	34

10

20

【0060】

実施例 2 プロトカテク酸によるチロシンフェノールリアーゼの阻害率評価

(1) プラスミドの宿主細胞への導入

実施例 1 (1) で得られた各プラスミド (pET\_FnTPL、pET\_CfTPL、pET\_EwTPL) を用いて、ECOS competent E. coli BL21 (DE3) (ニッポン・ジーン社) にヒートショック法により形質転換した。得られた形質転換細胞液を LB Amp 寒天培地に塗布後 37 にて 16 時間静置し、得られたコロニーを形質転換体とした。

【0061】

30

(2) 形質転換株の培養

(1) で得られた形質転換体を表 3 に示す培地 (アンピシリンナトリウム 50 µg/mL を含む) 10 mL を含む大型試験管に接種し、37 にて一晩培養し目的タンパク質を発現させた。培養液を遠心分離 (3,000 rpm, 10 分) することにより培養上清を除去し、目的タンパク質を含有する菌体を得た。各プラスミド (pET\_FnTPL、pET\_CfTPL、pET\_EwTPL) を、形質転換後培養して得られた菌体をそれぞれ菌体 1、菌体 2、及び菌体 3 と称する。菌体 1 ~ 3 の宿主および発現される酵素を表 4 に記載した。

【0062】

40

50

【表 3】

培地組成 (1L あたり)	
Peptone	15 g
Yeast extract	12 g
NaCl	10 g
Glycerol	15 mL
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.375 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.36 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.28 g
Lactose	15 g
ピリドキシン塩酸塩	0.1 g

10

20

【0063】

【表 4】

菌体	宿主	発現される酵素
菌体 1	E. coli BL21 (DE3)	FnTPL
菌体 2	E. coli BL21 (DE3)	CfTPL
菌体 3	E. coli BL21 (DE3)	EwTPL

30

FnTPL (チロシンフェノールリアーゼ) : 配列番号 2

CfTPL (チロシンフェノールリアーゼ) : 配列番号 4

EwTPL (チロシンフェノールリアーゼ) : 配列番号 6

【0064】

(3) 菌体 1 ~ 3 を用いたプロトカテク酸によるチロシンフェノールリアーゼの阻害率の測定

(2) で得られた菌体 1、菌体 2、及び菌体 3 を用いて、プロトカテク酸の存在下におけるカテコールを基質とした 3, 4 - ジヒドロキシフェニアラニンへの変換率から、プロトカテク酸による各種チロシンフェノールリアーゼの阻害率を求めた。各種濃度のプロトカテク酸を含む表 5 の条件 1 ~ 6 に記載の反応溶液 (総量 200 μL) にて、カテコールから 3, 4 - ジヒドロキシフェニアラニンへの変換反応を終濃度 100 g/L の菌体を用いて 30、4 時間行った。得られた反応溶液中の 3, 4 - ジヒドロキシフェニアラニン濃度を参考例 1 の方法に従って定量し、下記式に従いカテコールから 3, 4 - ジヒドロキシフェニアラニンへの変換率を算出した。

40

【0065】

(数 2)

カテコールから 3, 4 - ジヒドロキシフェニアラニンへの変換率 (%) = 100 × [ 反応終了時の 3, 4 - ジヒドロキシフェニアラニンの物質量 (mol) ] / [ 反応開始

50

前のカテコールの物質量 (mol)

【0066】

また、チロシンフェノールリアーゼのプロトカテク酸による阻害率は下記式に従って算出した。

(数3)

チロシンフェノールリアーゼのプロトカテク酸による阻害率(%) = 100 × [ 1 - (プロトカテク酸存在下におけるカテコールから3,4-ジヒドロキシフェニルアラニンへの変換率(%)) / (プロトカテク酸非存在下におけるカテコールから3,4-ジヒドロキシフェニルアラニンへの変換率(%)) ]

【0067】

【表5】

	条件1	条件2	条件3	条件4	条件5	条件6
プロトカテク酸 (g/L)	0	2	4	6	8	10
カテコール (g/L)	5	5	5	5	5	5
ピルビン酸ナトリウム (g/L)	10	10	10	10	10	10
硫酸アンモニウム (g/L)	66	66	66	66	66	66
アスコルビン酸ナトリウム (g/L)	4	4	4	4	4	4
ピリドキサルリン酸 (mM)	1	1	1	1	1	1
エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (g/L)	2	2	2	2	2	2
Tris/HCl (pH7.5) (mM)	100	100	100	100	100	100

10

20

【0068】

FnTPL、CfTPL及びEwTPLのプロトカテク酸による阻害率を比較した(表6)。

表6に示すように、いずれのTPLにおいても阻害率の値はプロトカテク酸の濃度に依存して上昇した。条件2~6のいずれにおいてもFnTPLのプロトカテク酸による阻害率が最も低い値となった。

30

【0069】

【表6】

各チロシンフェノールリアーゼのプロトカテク酸による阻害率(%)

	条件1	条件2	条件3	条件4	条件5	条件6
FnTPL (菌体1)	0	2	17	26	31	36
CfTPL (菌体2)	0	59	72	81	85	90
EwTPL (菌体3)	0	63	76	81	87	91

40

【0070】

実施例3 菌体触媒を用いたプロトカテク酸を基質とする3,4-ジヒドロキシフェニルアラニンの生産

(1)プラスミドの宿主細胞への導入

実施例1(2)で得られた各プラスミド(pET\_FnTPL-EcAroY-EcUbiX、pET\_CfTPL-EcAroY-EcUbiX、pET\_EwTPL-EcAroY-EcUbiX)を用いて、ECOS competent E. coli BL21(DE3)(ニッポン・ジーン社)にヒートショック法により形質転換した。得

50

られた形質転換細胞液を L B A m p 寒天培地に塗布後 3 7 にて 1 6 時間静置し、得られたコロニーを形質転換体とした。

【 0 0 7 1 】

( 2 ) 形質転換株の培養

( 1 ) で得られた形質転換体を表 3 に示す培地 ( アンピシリンナトリウム 5 0 μ g / m L を含む ) 1 0 m L を含む大型試験管に接種し、3 7 にて一晚培養し目的タンパク質を発現させた。培養液を遠心分離 ( 3 , 0 0 0 r p m , 1 0 分 ) することにより培養上清を除去し、目的タンパク質を含有する菌体を得た。各プラスミド ( p E T \_ F n T P L - E c A r o Y - E c U b i X 、 p E T \_ C f T P L - E c A r o Y - E c U b i X 、 及び p E T \_ E w T P L - E c A r o Y - E c U b i X ) を、形質転換後培養して得られた菌体をそれぞれ菌体 4 、菌体 5 、及び菌体 6 と称する。菌体 4 ~ 6 の宿主および発現される酵素を表 7 に記載した。

10

【 0 0 7 2 】

【 表 7 】

菌体	宿主	発現される酵素
菌体 4	E. coli BL21 (DE3)	FnTPL, EcAroY, EcUbiX
菌体 5	E. coli BL21 (DE3)	CfTPL, EcAroY, EcUbiX
菌体 6	E. coli BL21 (DE3)	EwTPL, EcAroY, EcUbiX

20

FnTPL (チロシンフェノールリアーゼ) : 配列番号 2

CfTPL (チロシンフェノールリアーゼ) : 配列番号 4

EwTPL (チロシンフェノールリアーゼ) : 配列番号 6

EcAroY (プロトカテク酸デカルボキシラーゼ) : 配列番号 1 8

EcUbiX (フラビンモノヌクレオチドプレニルトランスフェラーゼ) : 配列番号 2 4

【 0 0 7 3 】

( 3 ) 菌体 4 ~ 6 を用いたプロトカテク酸を基質とする 3 , 4 - ジヒドロキシフェニルアラニンの生産能の測定

30

( 2 ) で得られた菌体 4 、菌体 5 、及び菌体 6 を用いてプロトカテク酸を基質とする 3 , 4 - ジヒドロキシフェニルアラニンの生産能を評価した。各種濃度のプロトカテク酸およびピルビン酸を含む表 8 の条件 7 ~ 1 1 に記載の反応溶液 ( 総量 2 0 0 μ L ) にて、プロトカテク酸から 3 , 4 - ジヒドロキシフェニルアラニンへの変換反応を終濃度 1 0 0 g / L の菌体を用いて 3 0 、 4 時間行った。得られた反応溶液中の 3 , 4 - ジヒドロキシフェニルアラニン濃度を参考例 1 の方法に従って定量し、下記式に従いプロトカテク酸を基質とする 3 , 4 - ジヒドロキシフェニルアラニンの生産能を算出した。

【 0 0 7 4 】

( 数 4 )

40

プロトカテク酸を基質とする 3 , 4 - ジヒドロキシフェニルアラニンの生産能 ( % ) = 1 0 0 × [ 反応終了時の 3 , 4 - ジヒドロキシフェニルアラニンの物質量 ( m o l ) ] / [ 反応開始前のプロトカテク酸の物質量 ( m o l ) ]

【 0 0 7 5 】

50

【表 8】

	条件 7	条件 8	条件 9	条件 10	条件 11
プロトカテク酸 (g/L)	2	4	6	8	10
ピルビン酸ナトリウム (g/L)	1.4	2.9	4.3	5.7	7.1
硫酸アンモニウム (g/L)	66	66	66	66	66
アスコルビン酸ナトリウム (g/L)	4	4	4	4	4
ピリドキサルリン酸 (mM)	1	1	1	1	1
エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (g/L)	2	2	2	2	2
Tris/HCl (pH7.5) (mM)	100	100	100	100	100

10

## 【0076】

菌体 4、5、6 を用いたプロトカテク酸からの 3, 4 - ジヒドロキシフェニルアラニンの生産能を評価した (表 9)。

表 9 の示すように条件 7 ~ 11 において、3, 4 - ジヒドロキシフェニルアラニンの生産能は、FnTPL を発現させた菌体 4 を用いた場合には 60 ~ 80 %、CfTPL を発現させた菌体 5 を用いた場合には 44 ~ 57 %、EwTPL を発現させた菌体 6 を用いた場合には 24 ~ 38 % であった。プロトカテク酸からの 3, 4 - ジヒドロキシフェニルアラニンの生産能はいずれの条件においても、プロトカテク酸による活性阻害を受けにくい FnTPL を発現させた菌体 4 を使用した場合に最も高い値を示した。

20

## 【0077】

【表 9】

プロトカテク酸を基質とする 3, 4 - ジヒドロキシフェニルアラニンの生産能 (%)

	条件 7	条件 8	条件 9	条件 10	条件 11
菌体 4 (FnTPL 含有)	60	70	80	79	72
菌体 5 (CfTPL 含有)	44	52	48	57	44
菌体 6 (EwTPL 含有)	24	32	38	33	30

30

## 【0078】

参考例 1 3, 4 - ジヒドロキシフェニルアラニンの定量

3, 4 - ジヒドロキシフェニルアラニンの定量は HPLC により行った。HPLC 分析に供する反応液を 0.1 % リン酸にて適宜希釈した後、アクロプレップ 96 フィルタープレート (0.2 μm GHP 膜、日本ポール社) を用いて不溶物の除去を行った。HPLC の装置は、Chromaster (日立ハイテクサイエンス社) を用いた。分析カラムには、L - カラム ODS (4.6 mm I.D. x 150 mm、化学物質評価研究機構) を用い、溶離液 A を 0.1 M リン酸二水素カリウムの 0.1 % リン酸溶液、溶離液 B を 70 % メタノールとし、流速 1.0 mL / 分、カラム温度 40 の条件にてグラジエント溶出を行った。3, 4 - ジヒドロキシフェニルアラニンの検出には UV 検出器 (検出波長 280 nm) を用いた。標準試料 [3, 4 - ジヒドロキシ - L - フェニルアラニン (販売元コード A11311、富士フイルム和光純薬株式会社)] を用いて濃度検量線を作成し、濃度検量線に基づいて 3, 4 - ジヒドロキシフェニルアラニンの定量を行った。

40

50

【配列表】

2023074007000001.xml

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
<i>C 1 2 P</i> 13/22 (2006.01)	<i>C 1 2 P</i> 13/22	D
<i>C 1 2 N</i> 1/15 (2006.01)	<i>C 1 2 N</i> 1/15	
<i>C 1 2 N</i> 1/19 (2006.01)	<i>C 1 2 N</i> 1/19	
<i>C 1 2 N</i> 1/21 (2006.01)	<i>C 1 2 N</i> 1/21	
<i>C 1 2 N</i> 5/10 (2006.01)	<i>C 1 2 N</i> 5/10	

Fターム (参考) 4B050 CC04 DD02 LL01 LL05  
4B064 AE29 CA02 CA19 CC24 DA01 DA20  
4B065 AA26X AB01 AC14 BA02 CA27 CA29 CA44 CA60