(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012 年 8 月 9 日(09.08.2012)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2012/105495 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) *C12P 7/56* (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) *C12N 9/02* (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2012/051989

(22) 国際出願日: 2012 年 1 月 30 日(30.01.2012)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2011-018895 2011 年 1 月 31 日(31.01.2011) JP
特願 2011-018892 2011 年 1 月 31 日(31.01.2011) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 旭化成ケミカルズ株式会社(**Asahi Kasei Chemicals Corporation**) [JP/JP]; 〒1018101 東京都千代田区神田神保町一丁目１０５番地 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小西　一誠(**KONISHI Kazunobu**) [JP/JP]; 〒1018101 東京都千代田区神田神保町一丁目１０５番地 Tokyo (JP). 高谷　直樹(**TAKAYA Naoki**) [JP/JP]; 〒3058577 茨城県つくば市天王台一丁目１番１号　国立大学法人　筑波大学内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 岩瀬　吉和，外(**IWASE Yoshikazu** et al.); 〒1066036 東京都港区六本木一丁目６番１号　泉ガーデンタワー　アンダーソン・毛利・友常法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）
— 規則 13 の 2 に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示（規則 13 の 2.4(d)(i)及び 48.2(a)(viii)）
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a)）

WO 2012/105495 A1

(54) **Title**: PHENYLPYRUVATE REDUCTASE AND METHOD FOR MANUFACTURING OPTICALLY-ACTIVE PHENYLLACTIC ACID AND 4-HYDROXYL-PHENYLLACTIC ACID USING SAME ENZYME

(54) 発明の名称 : フェニルピルビン酸還元酵素並びに本酵素を用いた光学活性フェニル乳酸及び４－ヒドロキシ－フェニル乳酸の製造方法

(57) **Abstract**: The present invention provides a phenylpyruvate reductase by which highly-pure optically-active 3-phenyllactic acid and highly-pure 4-hydroxyl-phenyllactic acid can be efficiently obtained, a gene coding for the same, and a method for manufacturing optically-active 3-phenyllactic acid and 4-hydroxyl-phenyllactic acid using the reductase and gene.

(57) 要約: 本発明は、高純度の光学活性３－フェニル乳酸及び４－ヒドロキシフェニル乳酸を効率よく得られるフェニルピルビン酸還元酵素及びそれをコードする遺伝子並びにこれらを用いた光学活性３－フェニル乳酸及び４－ヒドロキシフェニル乳酸の製造方法を提供する。

明　細　書

発明の名称 ：

フェニルピルビン酸還元酵素並びに本酵素を用いた光学活性フェニル乳酸及び４－ヒドロキシ－フェニル乳酸の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、フェニルピルビン酸還元酵素及びその遺伝子並びにこれらを用いる光学活性フェニル乳酸及び光学活性４－ヒドロキシフェニル乳酸の製造方法に関する。

背景技術

[0002] ３－フェニル乳酸および４－ヒドロキシフェニル乳酸は、ともに乳酸菌より単離された抗菌物質である（非特許文献１～４）。

[0003] ３－フェニル乳酸の抗菌活性はAspergillus ochraceus、Penicillium roqueforti、Penicillium citrinumなどのカビだけでなく（非特許文献５）、Listeria monocytogenes、Staphylococcus aureus、Escherichia coli O157などのような有害なグラム陰性、陽性細菌にたいしても幅広い（非特許文献１、２、５～７）。この幅広い抗菌活性により３－フェニル乳酸は食品添加物としての利用の可能性が示唆されている。また、これ以外の医薬、農薬及びその中間体、芳香族バイオポリマー・プラスチック、液晶等の機能性材料、生体適合性（医療）材料等としても利用できる有用な化合物である。

[0004] ４－ヒドロキシフェニル乳酸も、３－フェニル乳酸と同様に乳酸菌由来であることから、食品添加物としての利用可能性が示唆されるだけでなく、これ以外の用途での抗菌性添加物、更には医薬、農薬及びその中間体として期待されている。

[0005] これら化合物の製造方法について、光学活性３－フェニル乳酸においては有機化学合成による製造を試みている報告が多数なされているが（特許文献１）、環境問題やコストの観点からこのような化学物質を使用しない新たな合成方法が望まれている。更に、４－ヒドロキシフェニル乳酸においては、

高純度に大量生産する技術が確立されておらず、有機化学合成にて、ラセミ体が主な生産物、すなわちＤ体及びＬ体が混在した状態を試験試薬として少量市販しているのが現状であり、より生成効率の高い合成方法が切望されている。

[0006] これら課題の潜在的解決手段として、触媒や有機溶媒等の化学物質を使用せずに所望の化合物を大量生産し得る微生物培養や酵素による光学活性３－フェニル乳酸あるいは４－ヒドロキシフェニル乳酸の合成方法が挙げられる。

[0007] ３－フェニル乳酸の生産菌として子嚢菌Geotrichum candidum（非特許文献２）、プロピオン酸生産細菌Propionibacterium freudenreichii（非特許文献８）、様々な乳酸菌（非特許文献５、９～１１）が知られている。

[0008] しかし、３－フェニル乳酸の生産に関わる酵素の分子レベルでの研究については、2008年になりLactobacillus. sp SK007のD,L-乳酸デヒドロゲナーゼ（D,L-Lactate dehydrogenase）が精製（非特許文献１２）されたのみであった。また、３－フェニル乳酸の前駆体であると予想されるフェニルピルビン酸に対して酵素活性をもつ酵素の遺伝子がクローニングされた例としては、Lactobacillus plantarum SK002由来の組換えD,L-乳酸デヒドロゲナーゼ（D,L-Lactate dehydrogenase）（非特許文献１３）、Rhizobium etli CFN 42由来の組換えグリオキシル酸レダクターゼ／ヒドロキシピルビン酸還元酵素（Glyoxylate reductase/Hydroxypyruvate reductase）（非特許文献１６）の２例のみであるが、これらが３－フェニル乳酸の生産に関与するかどうかは不明である。

[0009] また、特許文献２及び３には、光学活性３－フェニル乳酸生産菌の報告があるが、これらはＲ体とＳ体とが混在しており、望ましくない。

[0010] 特許文献４には、PF1022物質生産菌の糸状菌Mycelia sterilia（FERM BP-2671）の産生酵素が、フェニルピルビン酸に作用してこれを還元し、（Ｒ）－２－ヒドロキシ－３－フェニルプロピオン酸に変換することが報告されている。

[0011] しかしながら、高純度の光学活性３－フェニル乳酸を効率よく得るには至っていないのが実状である。

[0012] 以上のように、高純度の光学活性３－フェニル乳酸及び４－ヒドロキシフェニル乳酸を大量に得ることが可能な製造方法は未だ確立されておらず、その開発が強く望まれている。

先行技術文献

特許文献

[0013] 特許文献1：特開２００３－１９２６３３号公報

特許文献2：特開平９－３７７９２号公報

特許文献3：特開２０００－３００２８４号公報

特許文献4：国際公開２００１／８１５６３号パンフレット

非特許文献

[0014] 非特許文献1：Lavermicocca, P.; Valerio, F.; Evidente, A.; Lazzaroni, S.; Corsetti, A.; Gobbetti, M., Appl. Environ. Microbiol. 2000 66 4084-4090

非特許文献2：Dieuleveux, V.; Van Der Pyl, D.; Chataud, J.; Gueguen, M., Appl. Environ. Microbiol. 1998 64 800-803

非特許文献3：Paola La et al., “Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough Lactobacillus plantarum strain 21B”, Applied and Environmental Microbiology (2000), 66(9), 4084-4090.

非特許文献4：Wanmeng Mu et al., “Production of 4-hydroxyphenyllactic acid by Lactobacillus sp. SK007” fermentation Journal of Bioscience and Bioengineering (2010), 109(4), 369-371.

非特許文献5：Ohhira, I.; Kuwaki, S.; Morita, H.; Suzuki, T.; Tomita, S.; Hisamatsu, S.; Sonoki, S.; Shinoda, S., Biocontrol Sci. 2004 9 77-81

非特許文献6：Dieuleveux, V.; Gueguen, M.; J. Food Prot. 1998 61 1281

-1285

非特許文献7：Dieuleveux, V.; Lemarinier, S.; Gueguen, M.; Int. J. Food Microbiol. 1998 40 177-183

非特許文献8：Thierry, A.; Maillard, M., 2002 82 17-32

非特許文献9：Strom, K.; Sjogren, J.; Broberg, A.; Schnurer, Appl. Environ. Microbiol. 2002 68 4322-4327

非特許文献10：Magnusson, J.; Strom, K.; Roos, S.; Sjogren, J.; Schnurer, Microbiol. Lett. 2003 219 129-135

非特許文献11：Valerio, F.; Lavermicocca, P.; Pascale, M.; Visconti, A., Microbiol. Lett. 2004 233 289-295

非特許文献12：Li, X.; Pan, . Mu, W. & Zhang, T. (2008)., Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56 7 2392-399

非特許文献13：Jianghua,J.; Wanmeng, M.; Tao, Z.; Bo .;, Appl. Biochem. Biotechnol. 2009 (in press)

非特許文献14：Ishikura, Y.; Tsuzuki, S.; Takahashi, O.; Tokuda, C.; Nakanishi, R.; Shinoda, T.; Taguchi, H., J. Biochem. 2005 138, 741-749

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0015] 本発明は、斯かる問題点と実状に鑑み、高純度の光学活性３－フェニル乳酸及び４－ヒドロキシフェニル乳酸を効率よく得られるフェニルピルビン酸還元酵素及びそれをコードする遺伝子並びにこれらを利用した光学活性３－フェニル乳酸及び４－ヒドロキシフェニル乳酸の合成方法を提供しようとするものである。

課題を解決するための手段

[0016] 本発明者は、既知の乳酸菌のみならず、より広範囲の微生物から試行錯誤を繰り返した結果、グルコースから光学活性フェニル乳酸を大量に生産する新規な酵母菌を見出した。そして、光学活性フェニル乳酸を大量生産するのは、当該酵母菌が、特にフェニルピルビン酸を基質とし、これに高い親和性

を有してかつ作用して専ら光学活性フェニル乳酸を生成するという新規かつ特殊なフェニルピルビン酸還元酵素（以下、「ＰＰＲ」ともいう）を有すること、しかも当該ＰＰＲが新たな酵素であることも見出した。更に、この新規で特異なＰＰＲをコードする遺伝子（以下、「ppr遺伝子」ともいう）をクローン化し、この形質転換体を用いることにより特異な新規なＰＰＲを遺伝子工学的に製造できることを見出した。また、この形質転換体によってもグルコースから光学活性フェニル乳酸が得られることも見出した。

[0017] 更に、本発明者は、本発明のＰＰＲが４－ヒドロキシフェニルピルビン酸に対しても親和性を有しており、４－ヒドロキシフェニルピルビン酸を基質として、これから、高純度の光学活性４－ヒドロキシフェニル乳酸を、具体的には高純度のＤ－４－ヒドロキシフェニル乳酸を選択的に、生産することができることを見出した。しかも、その原材料（基質）として安価で安定的に入手可能なＤ－グルコースを利用しても大量に生産できる高純度の光学活性４－ヒドロキシフェニル乳酸の製造方法も確立することができることを見出した。

[0018] 因みに、本発明のＰＰＲは、特許文献１記載の酵素とは２４％の同一性しかなく、また、従来知られている酵素とも約４０％程度の同一性しかない新規な酵素である。しかも、後記実施例に示すように、本発明のＰＰＲは、既存のＨＰＰＲ又はＧＲＨＰＲファミリーには属しておらず、新規ファミリーを形成するものでもある。しかも、本発明のＰＰＲは、従来のＰＰＲよりも酵素活性が数十倍も高く、産業上の利用可能性も高いものである。また、斯様な特異な酵素を生産し、またグルコースから光学活性フェニル乳酸を生産する本発明の新規酵母菌も重要な遺伝資源であることも明白である。

[0019] すなわち、本発明は、以下の発明に係るものである。

[0020] 〔１〕フェニルピルビン酸を基質としてＤ－フェニル乳酸を生成するフェニルピルビン酸還元酵素をコードするポリヌクレオチドであって、

（ａ）配列番号５に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド、

（ｂ）配列番号５に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリ

ンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、

（ｃ）配列番号５に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドと６０％以上の同一性を有する塩基配列からなるポリヌクレオチド、

（ｄ）配列番号６，７又は８に示される塩基配列を含むポリヌクレオチド、

（ｅ）配列番号４に示されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、

（ｆ）配列番号４に示されるアミノ酸配列において、１若しく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をコードするポリヌクレオチド、及び

（ｇ）配列番号４に示されるアミノ酸配列と６０％以上の同一性を有するアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、

からなる群より選択されるポリヌクレオチド。

〔２〕フェニルピルビン酸を基質としてＤ－フェニル乳酸を生成するフェニルピルビン酸還元酵素であって、

（ａ）配列番号４に示されるアミノ酸配列、

（ｂ）配列番号４に示されるアミノ酸配列において、１若しく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、又は

（ｃ）配列番号４に示されるアミノ酸配列と６０％以上の同一性を有するアミノ酸配列、

のいずれかを含む、フェニルピルビン酸還元酵素。

[0021] 〔３〕〔１〕に記載のヌクレオチドを含有する組換えベクター。

[0022] 〔４〕〔３〕に記載の組換えベクターを含む形質転換体。

[0023] 〔５〕宿主が微生物である〔４〕に記載の形質転換体。

[0024] 〔６〕前記微生物が大腸菌又はフェニルアラニン若しくはチロシン生産性組換微生物である〔５〕に記載に形質転換体。

[0025] 〔７〕次の（ａ）、（ｂ）又は（ｃ）のタンパク質からなるフェニルピルビン酸還元酵素を用いて、フェニルピルビン酸又は４－ヒドロキシフェニルピ

ルビン酸を基質としてＤ－フェニル乳酸又はＤ－４－ヒドロキシフェニル乳酸を生成させ、これを回収することを特徴とするＤ－フェニル乳酸又はＤ－４－ヒドロキシフェニル乳酸の製造方法：

（ａ）配列番号４に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、

（ｂ）配列番号４に示されるアミノ酸配列において、１若しく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るタンパク質、又は

（ｃ）配列番号４に示されるアミノ酸配列と６０％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質。

[0026] 〔８〕前記フェニルピルビン酸還元酵素の反応条件が、反応温度２０～４０℃、ｐＨ６～７であることを特徴とする〔７〕に記載のＤ－フェニル乳酸又はＤ－４－ヒドロキシフェニル乳酸の製造方法。

[0027] 〔９〕次の（ａ）、（ｂ）又は（ｃ）のタンパク質からなるフェニルピルビン酸還元酵素をコードする遺伝子を含む微生物を用いて培養し、微生物基質からＤ－フェニル乳酸又はＤ－４－ヒドロキシフェニル乳酸を生成させ、これを回収することを特徴とするＤ－フェニル乳酸又はＤ－４－ヒドロキシフェニル乳酸の製造方法：

（ａ）配列番号４に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、

（ｂ）配列番号４に示されるアミノ酸配列において、１若しく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るタンパク質、又は

（ｃ）配列番号４に示されるアミノ酸配列と６０％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質。

[0028] 〔１０〕前記微生物が、ウィッケルハミア属酵母若しくはこれを親株とした変異株又は〔４〕又は〔５〕に記載の形質転換体であることを特徴とする〔９〕に記載のＤ－フェニル乳酸又はＤ－４－ヒドロキシフェニル乳酸の製造方法。

[0029] 〔１１〕前記微生物基質がＤ－グルコース、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－チ

ロシン、フェニルピルビン酸及び４－ヒドロキシフェニルピルビン酸から選ばれる１種以上の基質であることを特徴とする〔９〕に記載のＤ－フェニル乳酸又はＤ－４－ヒドロキシフェニル乳酸の製造方法。

[0030] 〔１２〕ウィッケルハミア属酵母が、Wicherhamia fluorescensである〔１０〕に記載のＤ－フェニル乳酸又はＤ－４－ヒドロキシフェニル乳酸の製造方法。

[0031] 〔１３〕ウィッケルハミア　フルオレセンス（Wicherhamia fluorescens）TK1と命名され、FERM　AP-22048として寄託された微生物。

発明の効果

[0032] 本発明によれば、高純度の光学活性３－フェニル乳酸及び４－ヒドロキシフェニル乳酸を効率よく得ることが可能となる。

図面の簡単な説明

[0033] [図1]Wickerhamia fluorescensTK1菌株の光学顕微鏡像

[図2]「Ｌ－フェニル乳酸とＤ－フェニル乳酸のＨＰＬＣプロフィール」（ａ）はＤ－３－フェニル乳酸及びL－３－フェニル乳酸の標品／Ｌ－フェニル乳酸は22.4分で最初のピークとして溶出され、Ｄ－フェニル乳酸は31.7分で溶出された。；（ｂ）はW.fluorescens TK1のMM培地培養後の上清；（ｃ）はW. fluorescens TK1のGPAMM培地培養後の上清；（ｄ）は本菌株から得られた酵素にてフェニルピルビン酸の基質を処理したものである。

[図3]W. fluorescensTK1菌株の培養中の菌体量と光学活性フェニル乳酸の生産量を示すものである。

[図4]W. fluorescensTK1菌株の培養中の菌体量、光学活性フェニル乳酸（ＰＬＡ）の生産量、フェニルピルビン酸（ＰＰＡ）の生産量を示すものである。

[図5]W. fluorescensTK1菌株の培養中の菌体量と光学活性フェニル乳酸（ＰＬＡ）の生産量、Ｌ－フェニルアラニン（Ｐｈｅ）の生産量を示すものである。

[図6]W. fluorescensTK1菌株の培養時間（２、１２、４８時間）ごとのフェ

ニルピルビン酸還元酵素活性を示すものである。

[図7]W. fluorescensTK1菌株のＰＰＲの各ｐＨ〔Tris-HCl緩衝液（pH 7, 7.5, 8）、リン酸緩衝液（pH 5.5, 6, 6.5, 7）〕ごとの、ｐＨ６．５のＰＰＲ活性を１００としたときの各ＰＰＲ活性（相対比）を示すものである。

[図8]「ＰＰＲの分子量」（ａ）本酵素ＰＰＲのＳＤＳ－ＰＡＧＥ電気泳動分析（右側）；（ｂ）本酵素ＰＰＲのゲル濾過分析（黒菱形）を示すものである。

[図9]本発明のppr遺伝子（pprA遺伝子）を含むプラスミドベクターの作製の例示である。

[図10]本発明のppr遺伝子（pprA遺伝子）を含む形質転換体の例示である。

[図11]「ＰＰＲ由来のトリプシンペプチドの１つに対するＭＡＬＤＩ－ＴＯＦのＭＳスペクトラ及びＭＡＬＤＩ－ＱＩＴ－ＴＯＦのＭＳ^{2}スペクトラ／W. fluorescens NRRLYB-4819由来のＰＰＲの陽イオンＭＡＬＤＩ－ＴＯＦマススペクトラ」本発明の内部アミノ酸配列のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦによるＭＳスペクトラである。

[図12]「ＰＰＲ由来のトリプシンペプチドの１つに対するＭＡＬＤＩ－ＴＯＦのＭＳスペクトラ及びＭＡＬＤＩ－ＱＩＴ－ＴＯＦのＭＳ^{2}スペクトラ／パネル中に示されたm/z 2000.0（ａ）及び2427.3（ｂ）におけるマスイオンピークのＭＳ／ＭＳスペクトラ」本発明の内部アミノ酸配列のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦによるＭＳスペクトラである。（ａ）配列番号２に示すアミノ酸配列；（ｂ）配列番号３に示すアミノ酸配列。

[図13]「nested PCR産物のアガロースゲル電気泳動」　N末端アミノ酸配列（配列番号１）と内部アミノ酸配列（配列番号３）の情報を基に、得られた935 bpのＤＮＡ断片のアガロースゲル電気泳動を示す。１：pprAのＰＣＲ産物
Ｍ：ＤＮＡマーカー

[図14]「W.fluorescens TK1　PPR 遺伝子のヌクレオチド配列及びその推定アミノ酸配列」W. fluorescensTK1菌株由来のppr遺伝子及びそのアミノ酸配列を示す。ＭＡＬＤＩ－ＱＩＴ－ＴＯＦ　ＭＳ分析で決定されたＰＰＲの内部

アミノ酸配列を枠囲で示す。Primer NPとOligo dTの位置を矢印で示す。nested primer 2427Pを点線矢印で示す。終止コドンを星印で示す。

[図15]「pprAをプローブとして用いた全ＤＮＡのサザンブロット分析」制限酵素（HindIII、EcoRI、PstI、BamHI）で処理したW. fluorescens TK1菌株の全DNAに対して、pprA遺伝子の配列を含むＤＮＡ断片をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを示す。W. fluorescens TK1菌株の全DNAを制限酵素HindIII、EcoRI、PstI、BamHIで消化し、電気泳動し、Zeta-Probe（登録商標）ブロッティングメンブレン（Bio-Rad）上にブロッティングし、プローブを用いてハイブリダイゼーションを行った。

[図16]「ＰＰＲ活性及び遺伝子発現におけるフェニルアラニンの効果」W. fluorescensTK1菌株をGPMM培地(+Phe)、GPAMM培地（＋PPA）、MM培地（Glc）で培養した際のＰＰＲ活性及びppr遺伝子（pprA遺伝子）発現量を示す。（Ａ）30℃で10時間培養したW.fluorescens TK1の無細胞抽出液中におけるＰＰＲの比活性。56 mMグルコース（Glc）、56 mMグルコース＋5 mMフェニルアラニン（+Phe）又は56 mMグルコース＋5 mMフェニルピルビン酸（+PPA）を含むＭＭ培地中で細胞を培養した。（Ｂ）pprA転写物の定量的ＰＣＲ。W.fluoerscens NRRLYB-4819を上記のとおり培養した。棒線はreal-time PCRで決定した相対的発現比率を示す。

[図17]「精製ｒＰＰＲ(recombinant PPR)のＳＤＳ－ＰＡＧＥ」ppr遺伝子を含む大腸菌が生産する酵素rPPRのＳＤＳ－ＰＡＧＥの結果を示す。Lane 1:精製ｒＰＰＲ　M: 分子量標準　(Bio-Rad Precision Protein Standard kit) 分子量を左端に示す。

[図18]「W.fluorescens TK1由来のＰＰＲと他の微生物由来のＰＰＲの推定アミノ酸配列マルチプルアライメント」W. fluorescensTK1菌株由来の酵素ＰＰＲと、他の微生物の酵素（DLDH、GRHPR、HPPR）とのアミノ酸配列を用いたアライメント解析結果を示す。CLUSTALXを用いてタンパク質の一次構造のアライメントを行った。配列は、C.dubliniensis（Accession No.:XP_002418129）、E.coli（P37666）、S.scutellarioide（Q65CJ7）及びL.plantarum（BAA1

4352）のＰＰＲ関連タンパク質である。星印は同一アミノ酸を示す。ドット及びコロンは保存アミノ酸による置換を示す。ダッシュは、コンピュータによって生成されたギャップを示す。枠囲はＮＡＤ結合モチーフの保存配列を示す。

[図19]W. fluorescensTK1菌株でのＤ－３－フェニル乳酸の生合成系を示す。

[図20]ppr遺伝子を含むフェニルアラニン生産性微生物の生産するフェニル乳酸を示す。

[図21]pprA遺伝子を含むフェニルアラニン生産性微生物（ATCC31882株/pHSGpprA）のＤ－グルコースを基質とした際の菌体濃度及びフェニル乳酸生産量を示す。

[図22]tyrA遺伝子を含む発現ベクターを示す。

[図23]４－ヒドロキシフェニル乳酸のＨＰＬＣ分析。Standard；Ｄ,Ｌ－４－ヒドロキシフェニル乳酸（左側；Ｌ－４－ヒドロキシフェニル乳酸／右側；Ｄ－４－ヒドロキシフェニル乳酸）；NST-ldhA菌株のＬ－４－ヒドロキシフェニル乳酸； NST-pprA菌株の生成のＤ－４－ヒドロキシフェニル乳酸。

発明を実施するための形態

[0034] １．本発明のフェニルピルビン酸還元酵素

（１）本発明のＰＰＲの酵素学的性質

（２）本発明のＰＰＲのアミノ酸配列及びこれをコードする遺伝子

（３）本発明のＰＰＲの取得方法

２．光学活性３－フェニル乳酸の製造方法

（１）本発明のＰＰＲによる光学活性フェニル乳酸の製造方法

（２）本発明のＰＰＲをコードする遺伝子を有する微生物による光学活性３－フェニル乳酸の製造方法

３．光学活性４－ヒドロキシフェニル乳酸の製造方法

（１）本発明のＰＰＲによる光学活性４－ヒドロキシフェニル乳酸の製造方法

（２）本発明のＰＰＲをコードする遺伝子を有する微生物による光学活性

４－ヒドロキシフェニル乳酸の製造方法

[0035] ＜１．本発明のフェニルピルビン酸還元酵素＞

本発明のフェニルピルビン酸還元酵素は、新規酵素であり、以下の酵素学的性質並びにアミノ酸配列及びこれをコードする遺伝子を有するものである。このＰＰＲは、ホモ二量体を形成しているものが好適である。

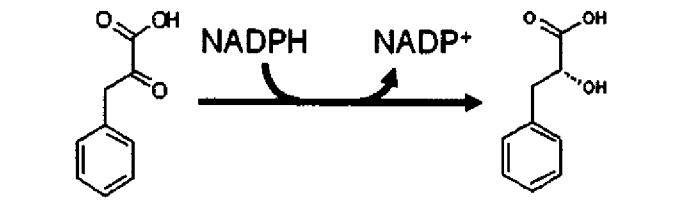
[0036] 本発明のＰＰＲによって、高純度のＤ－フェニル乳酸又はＤ－４－ヒドロキシフェニル乳酸を得ることができる。光学活性フェニル乳酸又は４－ヒドロキシフェニル乳酸を直接生成することが可能となるため、従来の有機合成物のようなほぼ等量混在するＤ体Ｌ体をそれぞれに分離したり、何れか一方を除去したりするといった分離精製工程を回避することにより作業効率も改善でき、しかも高純度化も容易である。高純度化された光学活性フェニル乳酸及びヒドロキシフェニル乳酸が容易に得られるので、種々の用途、特に医薬、食品添加物、農薬等といった高純度化が求められるような技術分野に利用しやすくなる。

[0037] （１）酵素学的性質

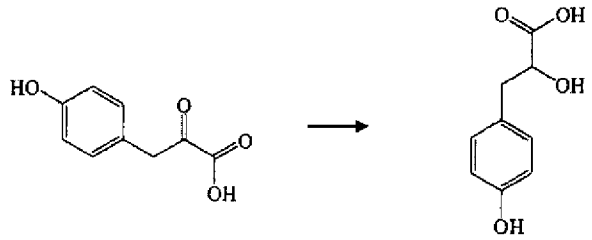
〔作用〕

本発明のＰＰＲは、フェニルピルビン酸及び４－ヒドロキシフェニルピルビン酸を基質とし、これに高い親和性を有し且つ作用して光学活性フェニル乳酸（Ｄ－３－フェニル乳酸）及び４－ヒドロキシフェニル乳酸（Ｄ－４－ヒドロキシフェニル乳酸）を生成するものである。エナンチオ選択的にＤ－３－フェニル乳酸及びＤ－４－ヒドロキシフェニル乳酸を生成するのが好適である。

[化1]



(Scheme 1)



(Scheme 2)

[0038] また、基質は、フェニルピルビン酸及びヒドロキシピルビン酸に限らず、この他に、グリオキシル酸を還元するのが好ましい。このうち、フェニルピルビン酸を基質としたときにk_{cat}/K_m値が最も大きい。

[0039] また、補酵素として、ＮＡＤＨ及びＮＡＤＰＨを利用することが可能であるが、ＮＡＤＰＨに対する特異性が高い。

[0040] フェニルピルビン酸及びＮＡＤＰＨにおけるk_{cat}/K_m値（特異度定数）が、３００～５００$s^{-1}mM^{-1}$（Ｋｍ値　０．４０±０．０７ｍＭ）となるような酵素が望ましいが、この特異度定数に特に限定されるものではない。なお、特異度定数k_{cat}/K_m値は、酵素が基質を生成物に変換する際の効率を示すものである。

[0041] このときの測定条件としては、以下のような手法が挙げられる。酵素反応液として５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ６．５）、２ｍＭフェニルピルビン酸、０．１ｍＭＮＡＤＰＨを用い、これに酵素を加え、温度２５℃にて反応を行い、紫外・可視分光光度計（３４０ｎｍ）を用いて、定量する。ＮＡＤＰＨの３４０ｎｍの波長の吸収のモル吸光係数は、６．２$mM^{-1}\cdot cm^{-1}$とする。

[0042] また、基質であるフェニルピルビン酸１モルと補酵素であるＮＡＤＰＨ１モルにより、光学活性フェニル乳酸（Ｄ－３－フェニル乳酸）を生成するものが好ましい。

[0043] このときのＤ－３－フェニル乳酸：Ｌ－３－フェニル乳酸のモル比は、１００～９０：０～１０、より１００～９５：０～５、更に１００～９８：０～２であるのが好ましく、更に、光学純度９９％以上のＤ－３－フェニル乳酸（光学活性フェニル乳酸）であるのが好適である。

[0044] またこの反応は不可逆反応であるのが好ましい。ここで不可逆反応とは、Ｄ－３－フェニル乳酸、Ｌ－３－フェニル乳酸、NAD^+、$NADP^+$の組み合わせを基質とした場合の酵素反応が起きない或いはフェニルピルビン酸が検出できないことをいう。

[0045]〔基質〕

４－ヒドロシキフェニルピルビン酸、３－フェニルピルビン酸、グリオキシル酸及びヒドロキシピルビン酸から選ばれる１種以上のものを原料（基質）とし、還元反応を触媒する。なお、ピルビン酸及びオキザロ酢酸を基質としないのが望ましい。

[0046]〔最適反応ｐＨ〕

Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝液（ｐＨ７～８）及びリン酸緩衝液（ｐＨ５～７）の緩衝液で各ｐＨ（２５℃）に調整した後、ｐＨ以外は上記〔作用〕記載の測定条件にて酵素活性を求めた場合、ｐ６～７、特にｐＨ６．５～７で高い活性を示す。

[0047]〔反応温度〕

ｐＨ６．５の２０～４０℃にて良好なフェニルピルビン酸還元反応を示す。

[0048]〔分子量〕

ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（Lammli等の方法）における測定で、本発明のＰＰＲは、分子量３０，０００～５０，０００ダルトン、特に分子量４０，０００ダルトンを示す。

[0049] また、ゲル濾過法における測定で、分子量７０，０００～９０，０００、特に分子量８０，０００を示す。

[0050] このときのゲル濾過の測定分析には、酵素を予め溶出緩衝液（10%グリセロール，1 mMジチオトレイトール（DTT，20 mMリン酸緩衝液，0.15 mM NaCl pH7）で平衡化させたスペロースゲル濾過カラム（Superose 6 10/300）に供し、カラム容量の１倍の溶出緩衝液で溶出する。

[0051] 標準タンパク質として、牛血清アルブミン（Ｍ．Ｗ．６７，０００）、キモトリプシノーゲン（Ｍ．Ｗ．２５，０００）、αーアミラーゼ（Ｍ．Ｗ．４５，０００）、βーアミラーゼ（Ｍ．Ｗ．２００，０００）を用いる。

[0052]〔金属イオン及び阻害剤の影響〕

２）金属イオンと阻害剤の影響

Cu^{2+}、Zn^{2+}、Fe^{2+}、WO^{2-}、Hg^{2+}から選ばれる１種以上の金属イオンによって、ＰＰＲ活性が強阻害される（９０～１００%程度阻害）。Ni^{2+}、Co^{2+}から選ばれる１種以上の金属イオンによってやや強く阻害される（３０～４０%程度阻害）。Mn^{2+}、Mg^{2+}、Ca^{2+}、Mo^{2+}、から選ばれる１種以上の金属イオンによって、殆ど阻害されないか或いは全く阻害されない（１５～０%程度阻害）。

[0053] ツィーン８０（Tween：登録商標）、２ーメルカプトエタノール（2-mercaptethanol）から選ばれる１種以上の阻害剤によって、あまり阻害されない（３０～５０%）。トリトンＸ－１００（tritonX）、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）から選ばれる１種以上の阻害剤によって、殆ど阻害されない（１０～２０%程度）。

[0054] なお、金属イオン及び阻害剤共に、各物質が１ｍＭになるように添加した以外は、上記〔作用〕記載の測定条件にて酵素活性を求める。

[0055]〔部分アミノ酸配列〕

本発明のＰＰＲは、少なくとも以下のＮ末端アミノ酸配列及び／又は内部アミノ酸配列の部分アミノ酸配列を有するものが好適である。なお、この部分アミノ酸配列は、１若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入されてい

てもよい。

[0056] 〔部分アミノ酸配列：Ｎ末端アミノ酸配列〕

Ｎ末端側のアミノ酸残基の配列：Ｎ末端側のＭＫＫＰＱＶＬＩＬＧＲＩの１２アミノ酸残基の配列（配列番号１）である。

[0057] なお、Ｎ末端側のアミノ酸残基の配列は、公知の手法（Edman, P.（1950）Acta Chem. Scand. 4: 283-293）にて得ればよい。一例として、ＳＤＳ－ポリアクリルアミド電気泳動法にて酵素を泳動し、得られた酵素バンドを電気的にポリビニリデンフロオライド（ＰＶＤＦ）膜等に移動させた後に、プロテインシーケンサーにて分析することで決定することができる。

[0058] 〔部分アミノ酸配列：内部アミノ酸配列〕

トリプシン消化ペプチドのアミノ酸残基の配列：ＮＩＱＡＩＹＧＮＷＧＧＬＡＳＦＧＧＦＫの１９アミノ酸残基の配列（配列番号２）及びＶＡＦＡＡＬＤＶＦＥＥＥＰＦＩＨＰＧＬＩＧＲの２２アミノ酸残基の配列（配列番号３）を有する。

[0059] なお、トリプシン消化ペプチドは、公知の手法（Shimizu, M., et al.（2009）Proteomics 9, 7-19）にて得ればよい。一例として、SDS-PAGEに泳動した精製した本発明のＰＰＲをゲルより切り出し、トリプシン（温度３６～３８℃、ｐＨ８～９、４～１８時間）によりゲル内消化して得られるものである。また、市販品のトリプシン消化ペプチドキットで行えばよく、具体的には、Trypsin Profile IGD Kit：ゲル内消化キット（SIGMA-ALDORICH社）等が挙げられる。

[0060] （２）本発明のＰＰＲのアミノ酸配列及びこれをコードする遺伝子（塩基配列）

本発明のＰＰＲには、次の（ａ）、（ｂ）及び（ｃ）のタンパク質が包含される。

[0061] （ａ）配列番号４に示すアミノ酸配列からなるタンパク質。

[0062] （ｂ）配列番号４に示すアミノ酸配列において、１若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失若しくは付加されたアミノ酸列からなり、フェニルピルビン

酸還元活性を有し、フェニルピルビン酸に対する高い親和性を有するタンパク質。

[0063] （ｃ）配列番号４で示されるアミノ酸配列と６０％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、フェニルピルビン酸還元活性を有し、フェニルピルビン酸に対する高い親和性を有するタンパク質。

[0064] 本発明の配列番号４に示すＰＰＲのアミノ酸配列と既知のフェニルピルビン酸還元酵素のアミノ酸配列との同一性を比較した結果、何れの既知のものとも同一性が約２０％～５０％程度と極めて低く、本発明のＰＰＲは新規な酵素であり、新たな酵素群を形成することが示唆されている。また、本発明のppr遺伝子は、本発明のＰＰＲをコードする遺伝子を包含することから、新規な遺伝子である。

[0065] 本発明において、アミノ酸配列及び塩基配列の同一性は、Lipman-Person法（Science, 227, 1435, （1985））等の公知のアルゴリズムによって計算され、またこれによって配列を比較することにより行うことができる。具体的には、遺伝情報処理ソフトウェアGenetyx-ver 8.1（ソフトウエア開発：ゼネティックス社）のホモロジー解析（Search homology）プログラムのサーチホモロジーやマキシムマッチングプログラムを用いて、同一性を算出することができる。例えば、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。

[0066] また、本発明において、転写開始領域は、プロモーター及び転写開始点を含む領域であり、リボソーム結合部位は開始コドンと共に翻訳開始制御領域を形成するShine-Dalgarno(SD)配列（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463 (1974)）に相当する部分である。

[0067] ここで、配列番号４に示すアミノ酸配列において、１若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失若しくは付加されたアミノ酸配列とは、配列番号４とそれぞれ機能的に等価なアミノ酸配列を意味し、１若しくは数個、好ましくは１～６個、より好ましくは１～３個のアミノ酸が置換、欠失若しくは付加されたアミノ酸配列であって、依然として、フェニルピルビン酸還元活性を有し

、フェニルピルビン酸に対する高い親和性を保持する配列をいう。また、付加には、両末端への１若しくは数個、好ましくは１～６個、より好ましくは１～３個のアミノ酸の付加も含まれる。

[0068] 前記機能的に等価なアミノ酸とは、少なくともフェニルピルビン酸還元活性及び４－ヒドロキシフェニルピルビン酸還元活性を有する酵素であればよく、更に付加的な性質を有していてもよい。更に、フェニルピルビン酸に対する高い親和性を有するのが好適である。また、配列番号５に示すppr遺伝子によりコードされるタンパク質と実質的に同じ機能、具体的には上述の本発明のＰＰＲの機能を有するのが好適である。

[0069] ここで、フェニルピルビン酸還元活性及び４－ヒドロキシフェニルピルビン酸還元活性を有するとは、上述のスキーム１及び２の如き、フェニルピルビン酸及び４－ヒドロキシフェニルピルビン酸をそれぞれＤ－３－フェニル乳酸及びＤ－４－ヒドロキシフェニル乳酸にすることを意味するが、その活性の程度は、その機能を発揮する限り、機能の高低は特に制限されず、すなわち配列番号４で示されるタンパク質と同程度のもののみならず、これより高いもの又は低いものであってもよい。

[0070] また、付加的な性質とは、配列番号４に示すアミノ酸配列からなるタンパク質に比し、安定性に優れている性質、反応温度やｐＨが異なるや広範囲という性質等が挙げられる。

[0071] また、配列番号４に示すアミノ酸配列において、６０％以上、好ましくは６５％以上、より好ましくは７０％以上、より好ましくは７５％以上、より好ましくは８０％以上、より好ましくは８５％以上、更に好ましくは９０％以上、より更に好ましくは９５％以上、特に好ましくは９８％以上の同一性を有するアミノ酸配列が好適である。

[0072] 後記実施例に示すように、本発明のＰＰＲの発見により新規な酵素群も発見したことから、本発明の配列番号４に示すアミノ酸配列からなるタンパク質と、上述の如くフェニルピルビン酸還元活性であってフェニルピルビン酸に対する高い親和性を少なくとも有するという機能的に等価な酵素で、かつ

６０％程度以上の同一性の範囲内にあるものであれば、この新規な酵素群に含まれると予測される。一般的に、６０％以上の相同性を示すタンパク質は類似の酵素の特異性を持つことが多いとされているため、このような相同性を示すものは同じ酵素群に含まれると考えられている。

[0073] 本発明のppr遺伝子は、配列番号４に示すアミノ酸配列からなるタンパク質又は当該アミノ酸配列と機能的に等価なアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子であるが、次の（ａ）～（ｄ）のポリヌクレオチドも包含される。このうち、次の（ａ）～（ｄ）が好ましい。

[0074] （ａ）配列番号５に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド。

[0075] （ｂ）配列番号５に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、且つフェニルピルビン酸還元活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

[0076] （ｃ）配列番号５に示される塩基配列と６０％以上の同一性を有する塩基配列からなり、且つフェニルピルビン酸還元活性を有し、フェニルピルビン酸に対する高い親和性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

[0077] （ｄ）配列番号６、７又は８に示される塩基配列を含み、且つフェニルピルビン酸還元活性を有し、フェニルピルビン酸に対する高い親和性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

[0078] 配列番号５に示す塩基配列において、好ましくは６５％以上、より好ましくは７０％以上、より好ましくは７５％以上、より好ましくは８０％以上、より好ましくは８５％以上、更に好ましくは９０％以上、より更に好ましくは９５％以上、特に好ましくは９８％以上の同一性を有する塩基配列が好適である。

[0079] すなわち、本発明のppr遺伝子には、配列番号５の塩基配列で示されるポリヌクレオチド（ＤＮＡ等）において、変異剤処理、ランダム変異、特定部位突然変異、欠損或いは挿入等によって部分的に塩基配列が変化したものであっても、これらのＤＮＡ変異体が配列番号５の塩基配列で示されるＤＮＡとストリンジエントな条件でハイブリダイズし、且つ少なくともフェニルピル

ビン酸還元活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドからなる遺伝子を包含するものである。例えば、１若しくは数個（例えば２～３個）の塩基配列が、置換、欠失若しくは付加された塩基配列等が挙げられる。また、付加には、両末端への付加も含まれる。ここで、「１若しくは数個」とは、１～６個、好ましくは１～３個程度をいう。

[0080] ここで、「ストリンジエントな条件」とは、例えばMolecular cloning-a laboratory manual, 2nd edition (Sambrook et al, 1989) に記載の条件が挙げられる。すなわち、６ＸＳＳＣ（１ＸＳＳＣの組成：０．１５Ｍ塩化ナトリウム、０．０１５Ｍクエン酸ナトリウム、ｐＨ７．０）、０．５％ＳＤＳ、５Ｘデンハート及び１００ｍｇ／ｍＬニシン精子ＤＮＡを含む溶液にプローブと共に６５℃で８～１６時間恒温し、ハイブリダイズさせる条件等が挙げられる。

[0081] また、上記（ｂ）～（ｄ）で示される遺伝子は、例えば、（ａ）で示される遺伝子に比べて、ｍＲＮＡの発現量が多い、そのｍＲＮＡの安定性が高い、翻訳されるタンパク質の安定性が優れている等の付加的な性質を有していてもよい。

[0082] また、これら（ａ）～（ｄ）遺伝子の上流に、転写開始制御領域、翻訳開始制御領域又は分泌シグナル領域の何れか１以上の領域を結合させてもよい。

[0083] なお、本発明において、転写開始領域は、プロモーター及び転写開始点を含む領域であり、リボソーム結合部位は、開始コドンと共に翻訳開始制御領域を形成するShine-Dalgarno(SD)配列 (Proc. Nalt. Acad. Sci. USA 74, 5463 (1974)) に相当する部位である。

[0084] また、本発明において、遺伝子の上流又は下流とは、複製開始点からの位置ではなく、上流とは対象として捉えている遺伝子又は領域の５’側に続く領域を示し、一方、下流とは対象として捉えている遺伝子又は領域の３’側に続く領域を示す。

[0085] （３）本発明のＰＰＲ（フェニルピルビン酸還元酵素）の取得方法

（ｉ）本発明のＰＰＲは、ウィッケルハミア属（Wickerhamia）酵母若しくはその変異株、又は前記ＰＰＲをコードする遺伝子若しくはその断片を導入した形質転換体（好適には微生物）によって生産、取得することが可能である。

[0086] 前記ウィッケルハミア属酵母は、子嚢菌酵母であり、かつ上述の酵素ＰＰＲをコードする遺伝子を有するものであれば特に限定されないが、フェニルピルビン酸からＤ－３－フェニル乳酸を生産する機能及び／又はＤ－グルコースからフェニルピルビン酸を経てこれから光学活性フェニル乳酸（Ｄ－３－フェニル乳酸）を生産する機能を有するものが好適である。

[0087] この酵母としては、例えば、Wickerhamia fluorescens並びにこれと同等の菌学的性質並びに生理学的性質を有する菌が挙げられる。

[0088] 更に、W. fluorescens TK１(FERM AP-22048)菌株（以下、「酵母菌ＴＫ１」ともいう）及びこれと同等の菌、並びにその変異株が挙げられる。ここで、変異株とは、野生株の酵母菌ＴＫ１株を、紫外線、電離放射線、亜硝酸、ニトロソグアニジン、エチルメタンスルホネート等の処理という公知の手法により、得ることができる。なお、変異株には、野生株からの変異株を更に変異させたものも含む。

[0089] 前記W. fluorescens TK１(FERM AP－22048)菌株の菌学的性質及び生理学的性質を以下に示す。

[0090]（ａ）２６Ｓ　ｒＤＮＡ－Ｄ１／Ｄ２塩基配列

配列番号９に示す塩基配列。

[0091]（ｂ）形態学的特徴

形状：レモン形、卵形、長卵形

増殖形式：増殖は両極出芽により、出芽部位は広く、偽菌糸の形成。

[0092] 胞子形成：子嚢にスポーツ帽形の子嚢胞子の形成。

[0093]（ｃ）生理・生化学的性状

糖発酵性：Ｄ－グルコース（＋）、サッカロース（＋）、Ｄ－ガラクトース（Ｗ）、マルトース（－）

炭素源資化性：Ｄ－グルコース（＋）、サッカロース（＋）、Ｄ－ガラクトース（＋）、マルトース（－）、イノシトール（－）

窒素源資化性：硝酸塩（－）

なお、前記酵母菌ＴＫ１は、２００７年１１月頃、日本国筑波県つくば市内の環境中の土壌や水を４０種採取し、適宜希釈後、ＹＰＤ寒天培地（後記実施例１参照）に塗布した。２８℃で２～４日培養後、現れたコロニーを適宜希釈後、新たなＹＰＤ寒天培地に接種することを繰り返し行い、純粋分離した。

[0094] さらに分離した菌株１白金耳を、Ｄ－グルコース添加ＭＭ液体培地（表１参照）に植菌し、２８℃で２日から４日培養した。各菌株の培養上清を公知の手法にて取得し、この培養上清中の光学活性フェニル乳酸を公知の測定法（例えばＯＤＳ液体クロマト分析、ガスクロマト分析等）にて測定し、光学活性フェニル乳酸の生産量が良好なものを選抜して、土壌より採取された本菌株ＴＫ１を得た。

[0095] 更に、本菌株の菌学的性質及び生理学的性質から、W. fluorescensに帰属すると推定され、本菌株をW. fluorescens ＴＫ１株と命名した。このWickerhamia fluorescens TK1株は、上述のことから新規な微生物として、２０１０年１２月１３日、〒３０５－８５６６　茨城県つくば市東１－１－１　つくばセンター　中央第６、独立行政法人　産業技術総合研究所　特許生物寄託センター（ＩＰＯＤ）に、Wickerhamia fluorescens TK1 (FERM AP-22048)として寄託した。

[0096] 酵母菌ＴＫ１菌株から、本発明のＰＰＲを生産するには、一般的な酵母培養用の培地に植菌し、適当な温度で培養すればよい。培養液からの本発明のＰＰＲの生成は、常法に従って行うことができる。具体的には、培養液を遠心分離し、菌体を除去した後、無細胞抽出液から公知の酵素分離精製法を用いて濃縮や回収することができる。分離精製法としては、例えば、ゲル濾過クロマトや限界ろ過膜等の濾過法、また硫安添加による酵素沈殿法等が挙げられる。

[0097] 本発明のＰＰＲは、上述のように自然界から得ることが可能であるが、その遺伝子を上述の微生物（好適には子嚢酵母菌）の染色体ＤＮＡからクローニングし、当該ＰＰＲを大量に生産、回収することもできる。

[0098] ppr遺伝子のクローニング方法としては、例えば、当該遺伝子を安定的に増幅できるＤＮＡベクターに連結させる、或いは当該遺伝子に維持できる染色体ＤＮＡ上に導入させる等の方法で本発明のＰＰＲをコードするＤＮＡを安定的に増幅し、更に当該遺伝子を安定にかつ効率よく発現させることが可能である宿主に導入し、本発明のＰＰＲを生産させる方法が採用できる。

[0099] なお、本発明のppr遺伝子は、公知の手法（例えば、「Sambrook, J., Fritch, E. F., and Maniatis, T. (1989) in Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vol. 2, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY」参照）にて取得すればよい。一例として、ＰＰＲ産生菌株からゲノムＤＮＡを抽出し、適当な制限酵素にて切断後、ファージベクターを用いて、ＰＰＲ産生菌株のゲノムＤＮＡからなるライブラリーを作製する。或いは、ＰＰＲ産生菌株から全ＲＮＡを抽出し、オリゴｄＴをプライマーとした逆転写酵素反応にてｍＲＮＡに対応したｃＤＮＡを調製後、ファージベクターを用いて、ＰＰＲ産生菌株のｃＤＮＡからなるライブラリーを作製する。

[0100] 上述の如きＮ末端アミノ酸配列及び内部アミノ酸配列をもとに、適当なプライマーを合成し、それを用いてＰＰＲ産生菌株由来のゲノムＤＮＡ又はｃＤＮＡを鋳型としたポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を行い、ppr遺伝子のＤＮＡ断片を増幅する。このＤＮＡ断片をプローブとして用い、ゲノムライブラリー又はｃＤＮＡライブラリーのスクリーニングを行う。このようにしてppr遺伝子の全領域又は発現に必要な領域を単離することが可能となる。これらのＤＮＡ断片の塩基配列を決定した後、翻訳開始コドンの上流及び翻訳終結コドンの下流に、ＰＣＲ等の手法により適応な制限酵素切断部位を導入し、本発明のppr遺伝子のみからなるポリペプチドを含む遺伝子断片を得ることが可能となる。

[0101] 〔組換えベクター及びその作製方法〕

また、本発明によれば、ＰＰＲをコードするポリヌクレオチド又はppr遺伝子を含む組換えベクターを適用することが可能となる。これにより、形質転換体を得、この形質転換体の培養等によって、ＰＰＲを遺伝子工学的に製造することが可能となる。

[0102] 本発明の組換えベクターの構築の手順及び方法は、遺伝子工学の分野で慣用されているものを用いることができる（Sambrook, J., Fritch, E. F., and Maniatis, T. (1989) in Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vol. 2, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY）。

[0103] 本発明において使用できるベクターとしては、宿主染色体ＤＮＡに組み込まれるものや、自己複製可能な自律的複製配列を有するベクターを宿主細胞内でプラスミド状態にて存在させるものが挙げられる。このプラスミドベクターとしては、例えば、大腸菌を宿主とする場合、pUC18、pBR322(タカラバイオ）等が挙げられ、コリネ細菌を用いる場合はpPK4等が挙げられる。なお、宿主細胞内に存在する遺伝子のコピー数は、１又は複数コピーの何れでもよい。

[0104] 本発明の組換えベクターは、例えば、ＰＰＲをコードするポリヌクレオチド配列の上流にプロモーター（制御領域）を、また下流にターミネーターをそれぞれ作動可能に連結し、場合によっては、遺伝子マーカー及び／又は他の制御配列を作動可能に連結することにより作製することが可能である。

[0105] 本発明の遺伝子へのプロモーターやターミネーターの連結及び発現ユニットのベクターへの挿入は、公知の方法（Sambrook, J., Fritch, E. F., and Maniatis, T. (1989) in Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vol. 2, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY）にて行うことが可能である。

[0106] ここで、本発明に用いるプロモーター及びターミネーターは、特に限定されず、例えば、３－ホスホグリセリン酸キナーゼ、グルタルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ等の解糖系酵素遺伝子の制御配列；トリプトファンシンターゼ等のアミノ酸合成系酵素遺伝子の制御配列；アミラーゼ、プロ

テアーゼ、リパーゼ、セルラーゼ等の加水分解酵素遺伝子の制御配列；硝酸還元酵素、オロチジンー５’ーリン酸脱水酵素、アルコール脱水酵素等の酸化還元酵素遺伝子の制御配列等が挙げられる。なお、各制御配列とは、各制御領域で、所望の機能を発揮し得るポリヌクレオチドのことを意味する。

[0107] なお、本発明の遺伝子を他のタンパク質の翻訳領域をコードする外来遺伝子と連結させて融合タンパク質として発現させてもよい。

[0108] また、組換えベクターへの遺伝子マーカーの導入は、例えば、制御配列にＰＣＲ法により適当な制限酵素切断部位を導入し、これをプラスミドベクターに挿入した後、薬剤耐性遺伝子及び／又は栄養要求性相補遺伝子等の選択マーカー遺伝子を連結することにより行うことができる。

[0109] 選択マーカーは、形質転換体の選択手法に応じて適宜選択することが可能であるが、例えば、薬剤耐性をコードする遺伝子や栄養要求性を相補する遺伝子を使用することができる。

[0110] この薬剤耐性遺伝子としては、デストマイシン、ベノミル、オリゴマイシン、ハイグロマイシン、Ｇ４１８、ブレオマイシン、フォスフィノスリシン、アンピシン、カナマイシン等の薬剤に対する遺伝子が挙げられる。

[0111] また、この栄養要求性を相補する遺伝子としては、argB遺伝子、pyr4遺伝子、trpC遺伝子、TRP1遺伝子、niaD遺伝子、LEU2遺伝子、URA3遺伝子等が挙げられる。

[0112] 〔本発明の組換えベクターを導入した形質転換体〕

本発明によれば、上述にて得られた組換えベクターを用いて宿主（好適には微生物）を形質転換し、形質転換体を得ることができる。

[0113] 使用される宿主は、遺伝子組換えの宿主として使用可能なもの、好ましくは微生物であれば特に限定されるものではない。使用できる宿主としては、例えば任意の細菌類や真菌類等の微生物が挙げられ、このうち、大腸菌、コリネ菌、乳酸菌、放線菌、酵母、糸状菌、具体的には、エシェリヒア（Escherichia）属、シュードモナス（Pseudomonas）属、フラボバクテリウム（Flavobacterium）属、バチルス（Bacillus）属、セラチア（Serratia）属、コリ

ネバクテリウム（Corynebacterium）属、ブレビバクテリウム（Brevibacterium）属、アグロバクテリウム（Agrobacterium）属、アセトバクター（Acetobacter）属、グルコノバクター（Gluconobacter）属、ラクトバチルス（Lactobacillus）属、ストレプトコッカス（Streptococcus）属又はストレプトマイセス（Streptomyces）属に属する微生物及びこれらの変異株等を用いることが好適である。組換えが容易な点から、より好ましくは、大腸菌又はこの変異株である。

[0114] このとき、これら微生物は、光学活性フェニル乳酸又は４－ヒドロキシフェニル乳酸が生産されやすいように、遺伝子の置換、挿入、欠失、不活化等の変異を施した組換微生物であるのが好適であり、この組換微生物としては、フェニルアラニン産生菌（フェニルアラニン生産性組換微生物）及びチロシン産生菌（チロシン生産性組換微生物）が好適である。

[0115] 上述のような遺伝子に変異を生じさせる手法としては、例えば、リコンビナントＰＣＲ法〔PCR Technology, Stockton press (1989)〕、部分特異的変位法〔Kramer, W. and Frits, H., J. Methods in Enzymology, 154,350 (1987)〕、ＳＯＥ(splicing by overlap extension)－ＰＣＲ法〔Gene, 77, 61, (1987)〕により調製されたＤＮＡ断片を用いる二重交差法、化学薬剤処理（Ｎ－メチル－Ｎ’－ニトロソグアニジン、亜硝酸等）する方法、目的遺伝子を化学合成する方法等が挙げられる。

[0116] また、フェニルアラニン生産菌は、公知技術を用いて、Ｌ－フェニルアラニンを大量生産（好ましくはＤ－グルコースを基質としてＬ－フェニルアラニンを大量生産）できるように、遺伝子を変異させた微生物であればよい。そのフェニルアラニン生産性組換微生物としては、フィードバック阻害が解除された３－デオキシ－Ｄ－アラビノヘプツロン酸－７－リン酸シンターゼ及びプレフェン酸デヒドロゲナーゼをコードするＤＮＡ断片を含む組換えベクターで形質転換されたtryR遺伝子及びtyrA遺伝子の欠失したエシェリヒア属微生物等が挙げられる。

[0117] より具体的な微生物としては、例えば、ATCC31882株、ATCC3188株3、ATCC3

1884株（American Type Culture Collection分譲）やAJ12740株（FERM P-12999）、AJ12741株（FERM P-13000）（特開1993-344881号公報）等のフェニルアラニン生産性組換大腸菌などが挙げられ、この他のフェニルアラニン生産性組換微生物としてはCorynebacteirum glutamicum等も挙げられる。

[0118] また、チロシン生産菌は、公知技術を用いて、Ｌ－チロシンを大量生産（好ましくはＤ－グルコースを基質としてＬ－チロシンを大量生産）できるように、遺伝子を変異させた微生物が好適である。そのチロシン生産性組換微生物としては、フェニルアラニン生産菌（例えば、E. coli ATCC31882(ATCCより入手)）に、tyrA遺伝子（配列番号２４：YP_002927556）を公知の手法にて導入して得られた組換え大腸菌；Ｌ－チロシン生産能を有し、且つＬ－フィードバック阻害が解除された変異型プレフェン酸デヒドロゲナーゼを保持するエシェリヒア属微生物等が挙げられる（例えば、特開2006-311833号公報及び特開2007-325592号公報等参照）。

[0119] 本発明の形質転換体（微生物）は、上述のように作製された遺伝子発現用の組換えベクターを、常法に従って前記宿主に導入することによって得ることが可能である。

[0120] この導入法としては、例えば、エレクトロポレーション法、ポリエチレングリコール法、アグロバクテリウム法、コンピテント法、酢酸リチウム法及び塩化カルシウム法等が挙げられる。使用する宿主細胞に応じて適宜選択すればよい。

[0121] そもそも、既知のフェニルピルビン酸還元酵素にて生成するフェニル乳酸の光学異性の知見は極めて少ない。また、そのなかで、生成されたフェニル乳酸がラセミ体であるとの報告がなされている。このような状況からは、光学活性フェニル乳酸を高濃度に、すなわち高純度化された光学活性フェニル乳酸を工業的に得ることが困難と考えられる。

[0122] このような状況において、本発明のＰＰＲは非常に高純度に光学活性フェニル乳酸を生成することが可能であり、エナンチオマー同士で生理活性が異なるような可能性も極めて低いか殆ど無い。しかも、不可逆的反応であるた

め、光学活性フェニル乳酸を高濃度に蓄積してもよいため、回収効率の点でも有利である。更に、本発明のＰＰＲは、フェニルピルビン酸に高い親和性を有しながら、これ以外に、４－ヒドロキシフェニルピルビン酸、グリオキシル酸、ヒドロキシピルビン酸と幅広いものを基質とすることができる。

[0123] また、本発明のＰＰＲのk_{cat}／K_m値は、既知のフェニルピルビン酸還元酵素のk_{cat}／K_m値の数十倍も高いことから、本発明のＰＰＲは、光学活性フェニル乳酸を大量生成することも可能である。

[0124] 更に、本発明のＰＰＲは、これをコードする遺伝子を用いた形質転換体にてこの酵素の大量生産が可能であるので、更に得られたＰＰＲを用いて光学活性フェニル乳酸を工業的に大量生産することも可能である。

[0125] ＜２．光学活性３－フェニル乳酸の製造方法＞

本発明の光学活性３－フェニル乳酸の製造方法は、フェニルピルビン酸からＤ－３－フェニル乳酸を生成できる製造工程（酵素反応系：上述のスキーム１参照）を少なくとも有していればよい。

[0126] 更に、Ｄ－グルコースやＬ－フェニルアラニン等の原料からフェニルピルビン酸を生成する製造工程を有するものが、製造コストや入手が容易なので、好適である。

[0127] Ｄ－グルコースからフェニルピルビン酸を生成する製造工程としては、特に限定されず、有機合成法や発酵法（生合成反応）等が挙げられるが、例えば、シキミ酸経路（Shikimate pathway）が挙げられる。

[0128] また、Ｄ－グルコースからＬ－フェニルアラニンを生成する製造工程としては、特に限定されず、例えば、特開平5-344811号公報や米国特許4681852号公報等の公知の手法が挙げられる。また、Ｌ－フェニルアラニンからフェニルピルビン酸を生成する製造工程は、アミノトランスフェラーゼ等のアミノ基転移酵素を用いる酵素反応系が挙げられる。

[0129] このとき、Ｄ－グルコースやＬ－フェニルアラニン等の原料からフェニルピルビン酸を生成できるような製造工程（例えば酵素や微生物等の発酵法による反応系）を、本発明の光学活性３－フェニル乳酸製造法に内包させてい

るのが好適である。

[0130] すなわち、本発明のＰＰＲ及び／又は本発明の微生物を用いて、基質から光学活性３－フェニル乳酸を生産し、光学活性３－フェニル乳酸を回収するのが好適である。

[0131] このとき、本発明のＰＰＲの酵素が少なくとも含まれているものを用いればよく、例えば、本発明の微生物を培養した培養液やこれから微生物を除去した培養液、微生物破砕液や破砕物を除去した無細胞抽出液等を用いてもよい。これらに、シキミ酸経路の反応のための一連の酵素群（具体的には、７－ホスホ－２－デヒドロ－３－デオキシアラビノヘプトン酸アルドラーゼ、３－デヒドロキナ酸シンターゼ、３－デヒドロキナ酸デヒドラターゼ、シキミ酸デヒドロゲナーゼ、シキミ酸キナーゼ、３－ホスホシキミ酸１－カルボキシビニルトランスフェラーゼ（５－エノールピルビルシキミ酸－３－リン酸シンターゼ）、コリスミ酸シンターゼ、コリスミ酸ムターゼ等）やフェニルアラニン合成系の酵素群（具体的には、プレフェン酸デヒドロゲナーゼ、チロシンアミノトランスフェラーゼ等）等が含まれていてもよい。

[0132] また、補酵素として、ＮＡＤＰＨ及び／又はＮＡＤＨを用いるのが好適であり、このうち、ＮＡＤＰＨが光学活性フェニル乳酸の収率が高まるので好ましい。

[0133] 本発明の光学活性３－フェニル乳酸製造法の反応形式は、特に限定されず、バッチ式で行っても良く、連続流通式で行ってもよい。

[0134] また、本発明のＰＰＲや本発明の微生物は、固定化されていてもよい。この固定化の手法は、公知の手法であれば特に限定されず、例えば、水不溶性の担体に微生物・酵素を物理的吸着、イオン結合、有結合を介して固定化する担体結合法；グルタルアルデヒドなどの二価性官能基をもつ試薬で架橋固定化する架橋法；網目構造をもつゲルや、半透性膜の中に微生物・酵素を閉じこめる包括法等が挙げられる。

[0135] また、反応に用いる溶媒は、極性又は非極性溶媒の何れでもよいが、水及び／又は水溶性溶媒が好ましく、９０～１００質量％の水が特に好ましい。

ここで、水溶性有機溶媒とは、ベンゼン環を有する化合物を溶解させやすいようなものが好ましく、例えば、直鎖又は分岐鎖等のアルコール類やアセトン等が挙げられる。この低級アルコール類（好適には炭素数１～５）としては、例えば、メタノール、エタノール、プロパノール等の一価アルコール類、１，３－ブタンジオール等の二価又は多価アルコール類が挙げられ、これらを適宜組み合わせても良い。

[0136] （１）本発明の酵素ＰＰＲによる光学活性フェニル乳酸の製造方法

本発明のＰＰＲを用いて、酵素基質から、光学活性３－フェニル乳酸を生産し、これを回収することが可能である。なお、上述のようにＰＰＲ以外の酵素も併用することによって連続的に光学活性３－フェニル乳酸を得てもよい。

[0137] ここで、酵素基質としては、フェニルピルビン酸とするのが、光学活性フェニル乳酸の収率が高まるので、好適である。

[0138] また、反応温度は、好ましくは５～５０℃、より好ましくは１０～４０℃、更に好ましくは２０～４０℃とするのが好適である。

[0139] また、反応時間（１ターン）は、好ましくは１２時間～１週間、より好ましくは２～４日間とするのが好適である。

[0140] また、反応ｐＨは、好ましくは５～８、より好ましくは６～７とするのが好適である。このときのｐＨ調整は、リン酸緩衝液等のような公知のｐＨ調整剤にて行えばよい。

[0141] （２）本発明のＰＰＲをコードする遺伝子を有する微生物による光学活性３－フェニル乳酸の製造方法

本発明の光学活性フェニル乳酸の製造方法は、次の（ａ）、（ｂ）又は（ｃ）のタンパク質からなるフェニルピルビン酸還元酵素をコードする遺伝子を含む微生物を用いて培養し、微生物基質から光学活性フェニル乳酸を生成させ、これを回収するのが好適である。

[0142] （ａ）配列番号５に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質

（ｂ）配列番号５に記載のアミノ酸配列において、１若しくは数個のアミ

ノ酸が置換、欠失、挿入したアミノ酸列からなり、フェニルピルビン酸還元活性を有し、フェニルピルビン酸に対する高い親和性を有するタンパク質

（ｃ）配列番号５で示されるアミノ酸配列と６０％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、フェニルピルビン酸還元活性を有し、フェニルピルビン酸に対する高い親和性を有するタンパク質。

[0143] ここで、この微生物は、上述の野生株（ＴＫ１菌株）及びその変異株、又は上述の形質転換体等をいい、好気・嫌気の何れでも良い。

[0144] このとき微生物基質としては、Ｄ－グルコース、Ｌ－フェニルアラニン、フェニルピルビン酸等から選ばれる１種以上のものが好ましい。

[0145] また、微生物基質をＤ－グルコースとした場合、安価で入手可能であり、かつ大量に光学活性フェニル乳酸を生産することが可能なので、好適であり、しかも単純な糖のグルコースから芳香族化合物、しかも光学活性である３－Ｄ－フェニル乳酸を大量生産することが可能なpprｒ遺伝子を見出したことは産業上極めて有益である。このような場合、本発明のＰＰＲをコードする遺伝子をＬ－フェニルアラニン生産性微生物に導入した組換微生物が好ましい。

[0146] なお、微生物にて光学活性フェニル乳酸を製造する場合、上述の如きフェニルピルビン酸還元酵素をコードする遺伝子を含む微生物以外に、上記微生物基質を生産させるため、シキミ酸経路の反応のための一連の酵素群をコードする遺伝子を有する微生物やフェニルアラニン合成系の酵素群をコードする遺伝子を有する微生物等の上記微生物基質を生産する微生物を利用してもよい。

[0147] 例えば、上記微生物基質を生産させる微生物を用いて前培養した後、本発明の微生物を用いて本培養すること；これら微生物を同時に使用して培養すること等が挙げられる。

[0148] 微生物培養に使用する培地としては、各微生物の生育に用いられる栄養培地に、少なくとも上記微生物基質を含んだものが好適である。このとき上記微生物基質は、培地中、好ましくは０．０１～２０％（質量／容量）、より

好ましくは０．１～３％（質量／容量）、更に好ましくは１～２％（質量／容量）とするのが好適である。

[0149] 前記栄養培地は、例えば、微生物が酵母の場合、培地１Ｌ中、Ｄ－グルコース　１～３０ｇ；グルコース以外の微生物基質　０～５ｇ；$NaNO_3$　５～７ｇ；ＫＣｌ　０．４～０．６ｇ；$MgSO_4 \cdot 7H_2O$０．４～７ｇ；KH_2PO_4　１～２ｇ；Hutner’s Trace elements　１～３ｍＬ；蒸留水を含むＭＭ培地が挙げられる。Hutner’s Trace elementsについては、後述の実施例の通りである。また適宜酵母エキス０～３％、ポリペプトン０～２％としてもよい。

[0150] また、例えば微生物が大腸菌の場合、培地１Ｌ中、Ｄ－グルコース　１～３０ｇ；グルコース以外の微生物基質　０～５ｇ；Na_2PO_4　５～７ｇ；KH_2PO_4　２～４ｇ；ＮａＣｌ　９～１１ｇ；NH_4Cl　５～７ｇ；$MgSO_4 \cdot 7H_2O$　０．４～７ｇ；$CaCl_2 \cdot H_2O$　０．０２～０．０４ｇ；チアミンＨＣｌ　０．０４～０．０５ｇ；トリプシン　０．２～０．４ｇ；トリプトファン　０．２～０．４ｇ；Hutner’s Trace elements　１～３ｍＬ；蒸留水を含むＭ９培地が挙げられる。

[0151] また、大腸菌の場合、培地１Ｌ中、Ｄ－グルコース　１～３０ｇ；グルコース以外の微生物基質　０～５ｇ；　Na_2HPO_4、１１～１３ｇ；KH_2PO_4　５～７ｇ；ＮａＣｌ　０．４～０．６ｇ；NH_4Cl　０．９～１．１ｇ；$MgSO_4 \cdot 7H_2O$　０．２～０．４ｇ；$CaCl_2 \cdot 2H_2O$　０．０１～０．０２ｇ；チアミンＨＣｌ　０．０１～０．０２ｇ；トリプトン　９～１１ｇ；５．００　ｇ／Ｌ　酵母エキス　４～６ｇ；Trace elements 2　１～３ｍＬ；蒸留水を含むフェニル乳酸生産培地が挙げられる。

[0152] なお、Hutner’s Trace elements及びTrace elements 2については、後述の実施例の通りである（表２及び表１２参照）。

[0153] 更に、トリプシン９～１１ｇ、酵母エキス４～５ｇを加えるのが好適である。

[0154] 培養条件は使用する微生物に応じて適宜設定すればよい。

[0155] 培養温度は、好ましくは５～５０℃、より好ましくは１０～４０℃、更に好ましくは２０～４０℃とするのが、微生物生育が良好であると共に基質及び生成物を析出させないので、好適である。

[0156] また、培養期間（１ターン）は、好ましくは０．５日～２週間程度、より好ましくは１週間程度、更に好ましくは３～５日程度とするのが好適である。

[0157] また、培養ｐＨは、好ましくは４～９、より好ましくは、酵母の場合６～７とするのが好適であり、大腸菌の場合６～８とするのが好適である。培養ｐＨ調整は適宜ｐＨ調整剤にて所定の範囲内になるように制御すればよい。

[0158] また、撹拌は、好ましくは１００～１０００ｒｐｍ、より好ましくは４００～６００ｒｐｍで行うのが好適である。

[0159] また、空気を用いて通気培養をする場合、好ましくは０．０１～１Ｌ／分、より好ましくは０．１～０．３Ｌ／分とするのが好適である。

[0160] 更に、上記培養基質の培養期間内の培地中の濃度は、所定の濃度内になるように調整するのが生産効率の点で好適であり、例えば５００ｇ／ＬのＤ－グルコース溶液を、好ましくは０．１～５ｇ／Ｌ／ｈ、より好ましくは１～２ｇ／Ｌ／ｈで、連続的に又は不連続的に添加してもよい。

[0161] ３－Ｄ－フェニル乳酸の回収法としては、特に限定されず、公知の分離精製方法を用いればよい。菌体の除去手段として、遠心分離や濾過等の公知の手段が挙げられる。また、３－Ｄ－フェニル乳酸の分離・精製手段としては、晶析、限外濾過、イオン交換、活性炭処理、クロマト分離等の公知の手段が挙げられる。

[0162] クロマト分離としては、例えばＯＤＳカラムクロマトを用いる手法等が挙げられる。また晶析としては、有機溶媒による抽出及び再結晶の手法等が挙げられる。好適な一例として、メタノール及びヘキサン（＝２：１～１：２）の混合溶媒：水＝２：１～１：２にて抽出するのが好適である。

[0163] ＜３．光学活性４－ヒドロキシフェニル乳酸の製造方法＞

本発明の光学活性４－ヒドロキシフェニル乳酸（Ｄ－４－ヒドロキシフェ

ニル乳酸）の製造方法は、４－ヒドロキシフェニルピルビン酸から光学活性４－ヒドロキシフェニル乳酸を生成できる製造工程（酵素反応系：上述のスキーム２参照）を少なくとも有していればよい。

[0164] 基質となる４－ヒドロキシフェニルピルビン酸は、フェニルアラニン及びチロシンの代謝中間体の一つであることから、これらの代謝系を利用した製造工程とすればよい。

[0165] 更に、Ｄ－グルコースやＬ－チロシン等の原料から光学活性４－ヒドロキシフェニル乳酸を生成する製造工程を有するものが、製造コストや入手が容易なので、好適である。

[0166] Ｄ－グルコースからＬ－チロシンを生成する製造工程としては、特に限定されず、例えば、特開2006-311833号公報等の公知の手法が挙げられる。また、Ｌ－フェニルアラニンからチロシン、次いで４－ヒドロキシフェニルピルビン酸を生成する製造工程は、フェニルアラニンヒドロキシラーゼやチロシンアミノトランスフェラーゼ等を用いる酵素反応系が挙げられる。Ｄ－グルコースから４－ヒドロキシフェニルピルビン酸を生成する製造工程としては、特に限定されず、有機合成法や発酵法（生合成反応）等が挙げられるが、例えば、シキミ酸経路（Shikimate pathway）が挙げられる。

[0167] このとき、Ｄ－グルコースやＬ－チロシン等の原料から４－ヒドロキシフェニルピルビン酸を生成できるような製造工程（例えば酵素や微生物等の発酵法による反応系）を、上述の光学活性４－ヒドロキシフェニル乳酸製造法に内包させているのが好適である。

[0168] すなわち、上述の生体触媒（好適には、酵素及び／又は微生物）を用いて、基質から光学活性４－ヒドロキシフェニル乳酸を生産し、ここから光学活性４－ヒドロキシフェニル乳酸（好適にはＤ－４－ヒドロキシフェニル乳酸）を回収するのが好適である。

[0169] このとき、前記酵素が少なくとも含まれているものを用いればよく、例えば、前記微生物を培養した培養液やこれから微生物を除去した培養液、微生物破砕液や破砕物を除去した無細胞抽出液等を用いてもよい。これらに、シ

キミ酸経路の反応のための一連の酵素群（具体的には、７－ホスホ－２－デヒドロ－３－デオキシアラビノヘプトン酸アルドラーゼ、３－デヒドロキナ酸シンターゼ、３－デヒドロキナ酸デヒドラターゼ、シキミ酸デヒドロゲナーゼ、シキミ酸キナーゼ、３－ホスホシキミ酸１－カルボキシビニルトランスフェラーゼ（５－エノールピルビルシキミ酸－３－リン酸シンターゼ）、コリスミ酸シンターゼ、コリスミ酸ムターゼ等）；フェニルアラニン合成系の酵素群（具体的には、プレフェン酸デヒドロゲナーゼ、チロシンアミノトランスフェラーゼ等）；フェニルアラニンヒドロキシラーゼ等が含まれていてもよい。

[0170] また、補酵素として、ＮＡＤＰＨ及び／又はＮＡＤＨを用いるのが好適であり、このうち、ＮＡＤＰＨが光学活性４－ヒドロキシフェニル乳酸の収率が高まるので好ましい。

[0171] 本発明の光学活性４－ヒドロキシフェニル乳酸製造法の反応形式は、特に限定されず、バッチ式で行っても良く、連続流通式で行ってもよい。

[0172] また、前記酵素や前記微生物は、固定化されていてもよい。この固定化の手法は、公知の手法であれば特に限定されず、例えば、水不溶性の担体に微生物・酵素を物理的吸着、イオン結合、有結合を介して固定化する担体結合法；グルタルアルデヒドなどの二価性官能基をもつ試薬で架橋固定化する架橋法；網目構造をもつゲルや、半透性膜の中に微生物・酵素を閉じこめる包括法等が挙げられる。

[0173] また、反応に用いる溶媒は、極性又は非極性溶媒の何れでもよいが、水及び／又は水溶性溶媒が好ましく、９０～１００質量％の水が特に好ましい。ここで、水溶性有機溶媒とは、ベンゼン環を有する化合物を溶解させやすいようなものが好ましく、例えば、直鎖又は分岐鎖のアルコール類やアセトンが挙げられる。この低級アルコール類としては、例えば、メタノール、エタノール、プロパノール等の一価アルコール類（好適には炭素数１～３）、１，３－ブタンジオール等の二価又は多価アルコール類が挙げられ、これらを適宜組み合わせても良い。

（１）本発明の酵素ＰＰＲによる光学活性４－ヒドロキシフェニル乳酸の製造方法

本発明のＰＰＲを用いて、酵素基質から、光学活性４－ヒドロキシフェニル乳酸を生産し、これを回収することが可能である。なお、上述のように本発明のＰＰＲ以外の酵素も併用することによって連続的に光学活性４－ヒドロキシフェニル乳酸を得てもよい。

[0174] ここで、酵素基質としては、４－ヒドロキシフェニルピルビン酸とするのが、光学活性４－ヒドロキシフェニル乳酸の収率が高まるので、好適である。

[0175] また、反応温度は、好ましくは５～５０℃、より好ましくは１０～４０℃、更に好ましくは２０～４０℃とするのが好適である。

[0176] また、反応時間（１ターン）は、好ましくは１２時間～１週間、より好ましくは２～４日間とするのが好適である。

[0177] また、反応ｐＨは、好ましくは５～８、より好ましくは６～７とするのが好適である。このときのｐＨ調整は、リン酸緩衝液等のような公知のｐＨ調整剤にて行えばよい。

[0178] （２）本発明のＰＰＲをコードする遺伝子を有する微生物による光学活性４－ヒドロキシフェニル乳酸の製造方法

本発明の光学活性４－ヒドロキシフェニル乳酸の製造方法は、本発明のＰＰＲをコードする遺伝子を含む微生物を用いて培養し、微生物基質から光学活性４－ヒドロキシフェニル乳酸を生成させ、これを回収するのが好適である。

[0179] ここで、この微生物は、上述の野生株及びその変異株、又は上述の形質転換体等をいい、好気・嫌気の何れでも良い。例えば、４－ヒドロキシフェニルピルビン酸還元酵素をコードする遺伝子を含む菌株、ＰＰＲ酵素をコードする遺伝子を含む菌株、及びATCC菌株等が挙げられる。

[0180] このとき微生物基質としては、Ｄ－グルコース、Ｌ－チロシン、４－ヒドロキシフェニルピルビン酸から選ばれる１種以上のものが好ましい。また、

本発明の酵素を使用する際に、他の酵素を組み合わせて光学活性４－ヒドロキシフェニル乳酸を生産することも可能である。

[0181] また、微生物基質をＤ－グルコースとした場合、安価で入手可能であり、かつ大量に光学活性４－ヒドロキシフェニル乳酸を生産することが可能なので、好適であり、しかも単純な糖のグルコースから芳香族化合物、しかも、Ｄ－４－ヒドロキシフェニル乳酸を選択的に高純度に大量生産することが可能なpprに着目して利用したことは産業上極めて有益である。このような場合、前記酵素をコードする遺伝子をベクター等を介してＬ－チロシン生産菌に導入した組換微生物が好ましい。

[0182] なお、微生物にて光学活性４－ヒドロキシフェニル乳酸を製造する場合、上述の如き前記酵素をコードする遺伝子を含む微生物以外に、上記微生物基質を生産させるためシキミ酸経路の反応のための一連の酵素群をコードする遺伝子を有する微生物やフェニルアラニン合成系の酵素群をコードする遺伝子、フェニルアラニンヒドロキシラーゼをコードする遺伝子を有する微生物等の前記微生物基質を生産する微生物を利用してもよい。

[0183] 例えば、上記微生物基質を生産させる微生物を用いて前培養した後、本発明の微生物を用いて本培養すること；これら微生物を同時に使用して培養すること等が挙げられる。

[0184] 微生物培養に使用する培地としては、各微生物の生育に用いられる栄養培地に、少なくとも上記微生物基質を含んだものが好適である。このとき上記微生物基質は、培地中、好ましくは０．０１～２０％（質量／容量）、より好ましくは０．１～３％（質量／容量）、更に好ましくは１～２％（質量／容量）とするのが好適である。

[0185] 前記栄養培地は、例えば、微生物が酵母の場合、培地１Ｌ中、Ｄ－グルコース　１～３０ｇ；グルコース以外の微生物基質　０～５ｇ；$NaNO_3$　５～７ｇ；ＫＣｌ　０．４～０．６ｇ；$MgSO_4 \cdot 7H_2O$　０．４～７ｇ；KH_2PO_4　１～２ｇ；Hutner’s Trace elements　１～３ｍＬ；蒸留水を含むＭＭ培地が挙げられる。Hutner’s Trace elementsについては、後述の

実施例の通りである。また適宜酵母エキス０～３％、ポリペプトン０～２％としてもよい。

[0186] また、例えば微生物が大腸菌の場合、培地１Ｌ中、Ｄ－グルコース　１～３０ｇ；グルコース以外の微生物基質　６～２４ｇ；Na_2HPO_4　３～１２ｇ；KH_2PO_4　０．５～１ｇ；ＮａＣｌ　０．５～２ｇ；NH_4Cl　０．０５～０．０５ｇ；$MgSO_4・7H_2O$　０．０１５～０．０３０ｇ；$CaCl_2・H_2O$　０．０１５～０．０５０ｇ；チアミンＨＣｌ　０．０５０～０．１０ｇ；トリプトファン　Hutner’s Trace elements　１～２ｍＬを含むＭ９培地が挙げられる。

[0187] また、培地１Ｌ中、Ｄ－グルコース　１～３０ｇ；グルコース以外の微生物基質　６～２４ｇ；　Na_2HPO_4、３～１２ｇ；KH_2PO_4　０．５～１ｇ；ＮａＣｌ　０．５～１．０ｇ；NH_4Cl　０．０５～１ｇ；$MgSO_4・7H_2O$　０．０１５～０．０３ｇ；$CaCl_2・2H_2O$　０．０１５～０．０５ｇ；チアミンＨＣｌ　１～１０ｇ；トリプトン　０～１．５ｇ；５．００　ｇ／Ｌ　酵母エキス　０．５～５ｇ；Trace elements 2　１～３ｍＬ；蒸留水を含むヒドロキシフェニル乳酸生産培地（フェニル乳酸生産培地）が挙げられる。

[0188] 更に、トリプトン５～２０ｇ（好ましくは９～１１ｇ）、酵母エキス４～７ｇを加えるのが好適である。

[0189] 培養条件は使用する微生物に応じて適宜設定すればよい。

[0190] 培養温度は、好ましくは５～５０℃、より好ましくは１０～４０℃、更に好ましくは２０～４０℃とするのが、微生物生育が良好であると共に基質及び生成物を析出させないので、好適である。

[0191] また、培養期間（１ターン）は、好ましくは０．５日～２週間程度、より好ましくは１週間程度、更に好ましくは３～５日程度とするのが好適である。

[0192] また、培養ｐＨは、好ましくは４～９、より好ましくは、酵母の場合６～７とするのが好適であり、大腸菌の場合６～８とするのが好適である。培養

ｐＨ調整は適宜ｐＨ調整剤にて所定の範囲内になるように制御すればよい。

[0193] また、撹拌は、好ましくは１００～１０００ｒｐｍ、より好ましくは４００～６００ｒｐｍで行うのが好適である。

[0194] また、空気を用いて通気培養をする場合、好ましくは０．０１～１Ｌ／分、より好ましくは０．１～０．３Ｌ／分とするのが好適である。

[0195] 更に、上記培養基質の培養期間内の培地中の濃度は、所定の濃度内になるように調整するのが生産効率の点で好適であり、例えば５００ｇ／ＬのＤ－グルコース溶液を、好ましくは０．１～５ｇ／Ｌ／ｈ、より好ましくは１～２ｇ／Ｌ／ｈで、連続的に又は不連続的に添加してもよい。

[0196] また、ｐＨは、６～８付近であればよい。

[0197] 上述の製造方法にて得られる光学活性４－ヒドロキシフェニル乳酸の回収法としては、特に限定されず、公知の分離精製方法を用いればよい。菌体の除去手段として、遠心分離や濾過等の公知の手段が挙げられる。また、光学活性４－ヒドロキシフェニル乳酸（Ｄ－４－ヒドロキシフェニル乳酸）の分離・精製手段としては、晶析、限外濾過、イオン交換、活性炭処理、クロマト分離等の公知の手段が挙げられる。

[0198] クロマト分離としては、例えばＯＤＳカラムクロマトを用いる手法等が挙げられる。

[0199] また晶析としては、有機溶媒による抽出及び再結晶の手法等が挙げられる。一例として、酢酸エチル及びヘキサン（＝２：１～１：２）の混合溶媒：水＝２：１～１：２にて抽出するのが好適である。このとき、塩酸等の酸にてｐＨ２～４とする等により酸性化するのが好ましい。

[0200] なお、本発明の製造方法を用いれば、ラセミ体でなく高純度のＤ－４－ヒドロキシフェニル乳酸を得ることもでき、分離精製の工程を簡略化することができるので、本技術は工業的生産には適している。しかも、これに適した酵素及び微生物を容易に得ることができるので、この点においても本技術は工業的生産に好適である。

[0201] なお、高純度として、何れか一方の割合が高いのが有利であり、好ましく

は８５％以上、より好ましくは９０％以上、更に好ましくは９５％以上、より更に好ましくは９８％以上であるのが有利である。

実施例

[0202] 以下に具体的な実施例を説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

[0203] ＜実施例１＞D-3-フェニル乳酸の生産菌のスクリーニング及びそれの生産するフェニルピルビン酸還元酵素（ＰＰＲ）の精製

（１）D-3-フェニル乳酸を生産するＴＫ１菌株の取得

日本国の茨城県つくば市内の環境中の土壌や水を数十箇所で採取し、適宜希釈後、ＹＰＤ寒天培地（２％酵母抽出液、１％ポリペプトン、１％Ｄ－グルコース／蒸留水　１Ｌ）に塗布した。２８℃で２日から４日培養後、現れたコロニーを適宜希釈後、新たなＹＰＤ寒天培地に接種することにより、純粋分離した。さらに分離した菌株１白金耳を表１に示すMinimum medium（以下、「ＭＭ」ともいう）液体培地に植菌し、好気条件にて、２８℃で２日から４日培養した。

[0204] 光学活性フェニル乳酸の生産量が良好なものを、以下の測定方法にて選抜し、そのうち１つをＴＫ１菌株とした。

[表1]

Minimum medium　（蒸留水１L）	
D-グルコース（ブドウ糖）	100mM
NH_4Cl	0.53ｇ（10mM）
ＫＣｌ	0.52ｇ
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.52ｇ
KH_2PO_4	1.35ｇ
*(Hutner’s) trace element	2mL
pH	7.2

[表2]

*(Hutner' s) trace elements	
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.16 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.50 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2.20 g
$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	0.11 g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.50 g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.16 g
H_3BO_3	1.10 g
Per liter	

[0205] 〔３－フェニル乳酸の定性及び定量方法〕

１）ガスクロマトグラフィー質量分析計（GC/MS）を用いた３－フェニル乳酸の定性

試料を、1% NaOH 200 μL、Methanol 167 μL、Pyridine 34 μLに完全に懸濁する。これに、Methyl chlorocarbonateを20 μL加え、激しく攪拌することにより試料をメチル化する。Methyl chlorocarbonateを加え攪拌する操作を繰り返した後、Chloroformを400 μL加え、攪拌する。次に、50 mM Sodium bicarbonateを加え、攪拌後の水層を除去する。得られたChloroform層に0.1gのSodium sulfateを加えることによりChloroform層を完全に脱水し、得られた溶液に含まれる有機酸をGC/MS（GCMS-QP2010 Plus、Shimadzu）を用いて測定する。このGC/MS分析の条件を以下に示す。

[0206] なお、培養液を分析する場合、培養液5 mLを、1% NaOHを用いてpHを9から10に調整し、遠心エバポレーターを用いて減圧乾燥し、これを試料として使用する。

[0207] 分析器：GC/MS-QP2010 Plus (Shimadzu)

カラム：DB-5 (0.32 mm x 30 m)

カラム温度：60 ℃ (2 min)-8℃/min-180℃ (5 min)-40℃/min-220℃ (5 min)

インターフェイス温度：230℃

イオンソース温度：250℃

キャリアガス：He

流量：30 mL/min

２）高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いた３－フェニル乳酸の定量

試料中の３－フェニル乳酸の定量はＨＰＬＣを用いて、以下の分析条件にて、分析する。

[0208] なお、培養液を分析する場合は、濾過や遠心分離等により菌体を除去した培養上清を試料として使用する。

[0209] 分析器：HP-1100 (Hewlett-Packard)

カラム：TSKgel ODS-80(登録商標) (4.6 × 150 mm, Tosoh, Tokyo, Japan)

カラム温度：28℃

流速：1.0 mL/min

移動相：20 mm potassium phosphate buffer (pH 2.5): methanol (6:4, v/v)

３）HPLCを用いたキラル分析

試料（酵素反応液）中の３－フェニル乳酸の光学異性を、HPLCを用いて、以下の分析条件にて、決定する。なお、培養液を分析する場合には、培養液から濾過や遠心分離等により菌体を除去した培養上清を試料として使用する。

[0210] 分析器：HP-1100 (Hewlett-Packard)

カラム：Nucleosil Chiral-1 (Macherey-Nagel)

カラム温度：60℃

流速：1.2 mL/min

移動相：0.5 mM CuSO4

[0211] （２）ＴＫ１菌株の同定

全容50 mLの試験管に分注したYPD培地 10 mLに、予め菌体を生育させたYPD寒天培地から、菌体を一白金耳植菌し、30℃で2日間、120 rpmで振とう培養

した。

[0212] 前培養液2.5 mLから菌体を遠心分離により集菌し、その沈殿を生理食塩水で洗浄した。これを10 mLのＭＭ液体培地全容50 mLの試験管に植菌し、30℃で2日間、120 rpmで振盪培養した。なお、嫌気条件下で培養する際には、試験管の気相を窒素で置換しブチルゴム栓をし、これを30℃、6日間、120 rpmで振とう培養した。

[0213] 〔26S rDNA-D1/D2塩基配列解析〕

抽出からサイクルシーケンスまでの操作は、DNA抽出（物理的破壊およびMarmur(1961)）、PCR（puReTaq Ready-To-Go PCR beads(Amersham Biosciences, NJ, USA)）、サイクルシーケンス BigDye Terminator v3.1 Kit (Applied Biosystems, CA, USA)、使用プライマー（NL1およびNL4（O'Donnell, 1993))、シーケンス（ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer System (Applied Biosystems, CA, USA))、相同性検索および簡易分子系統解析（ソフトウェア アポロン2.0（テクノスルガラボ), データベース アポロン DB-FU3.0（テクノスルガラボ), 国際塩基配列データベース（GeneBank/DDBJ/EMBL)）の各プロトコルに従った。

[0214] 〔生理性状試験〕

試験方法はBarnett et al. (2000)およびKurtzman and Fell (1998)に準拠し、培養は温度耐性試験を除き25℃で行った。表３に示す生理性状の試験を行った。その結果を表３に示す。

[表3]

Cultural and biochemical characterics of Strain TK1

Characterisities		Growth	Characterisities	Growth
D-Glucose	A	+	D-Glucuronate	-
	F	+	Glycerol	S
Maltose	A	-	DL-Lactate	S
	F	-	Erythritol	-
Sucrose	A	+	Succinate	L
	F	+	Trehalose	-
Galactose	A	+	D-Glucitol	+
	F	W	Ethanol	S
Melibiose		-	α-Methyl-D-glucoside	-
D-mannitol		S	Nitrate	-
Lactose		-	Nitrite	-
Inositol		-	Ethylamine	S
L-Sorbitol		-	35℃	-
Raffinose		L	37℃	-
2-Keto-D-gluconate		S	0.1% cycloheximide	+
D-Glucosamine		-	50% (w/v) D-glucose	+
Melezitose		-	60% (w/v) D-glucose	S
D-Gluconate		S	10% NaCl	S
D-Ribose		-	16% NaCl	-

A: assimilation; F: fermentation; +: positive; L: delayed positeive; W: weakly positive; S: slow positive; -: negative

[0215] 〔簡易形態観察〕

光学顕微鏡（BX　オリンパス、東京）を用いて簡易形態観察を行った。その結果を図１に示す。なお、バーは、５μｍである。

[0216] 〔ＴＫ１菌株の同定〕

アポロンDB-FUに対するBLAST (Altschul, S.F. et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410.) を用いた塩基配列の相同性検索の結果、Strain TK1菌株の26S rDNA- D1/D2塩基配列は、子嚢菌酵母の一種であるWickerhamia fluorescens の基準株である NRRL YB-4819のそれと100%の相同性を示した。GenBank/DDBJ/EMBLなどの国際塩基配列データベースに対しする相同性検索においても、Strain TK1菌株の26S rDNA-D1/D2塩基配列は、W. fluorescensのNRR YB-4819菌株に対して、100%の高い相同性を示した。

[0217] また簡易形態観察の結果、Strain TK1菌株の栄養細胞は、レモン形、卵形、長卵形であり、増殖は両極出芽により、出芽部位は広く、偽菌糸の形成が

認められた（図１）。また、培養開始19日目には、子嚢にスポーツ帽形の子嚢胞子を形成されることが確認された。これらの形態学観察はW. fluorescensの形態学的特徴と一致する（Kurtzman C.P., Fell J.W. The Yeasts: A Taxonomic Study, 4th edition Elsevier, Amsterdam, Netherlands.）。

[0218] 生理・生化学的性状試験の結果、Strain TK1菌株は糖発酵性を示し、炭素源としてイノシトールを資化せず、窒素源として硝酸塩を資化しなかった(表３)。これらはWickerhamia属の特徴と一致した（Kurtzman C.P., Fell J.W. The Yeasts: A Taxonomic Study, 4th edition. Elsevier, Amsterdam, Netherlands.）。

[0219] 以上の生理性状試験、簡易形態観察の結果は26S rDNA-D1/D2塩基配列の結果を支持するものであった。このことより、Strain TK1菌株は、W. fluorescensに帰属すると推定され、本菌株をW. fluorescens TK1と命名した。新規な微生物として、２０１０年１２月１３日、〒３０５－８５６６　茨城県つくば市東１－１－１　つくばセンター　中央第６、独立行政法人　産業技術総合研究所　特許生物寄託センター（ＩＰＯＤ）に、Wickerhamia fluorescens TK1（FERM AP-22048）として寄託した。

[0220] （３）W. fluorescens TK1菌株が生産する３－フェニル乳酸の光学異性

W. fluorescens TK1菌株が生産する3-フェニル乳酸の光学異性を決定した。培養上清を、上述の如きキラル分析（Nucleosil Chiral-1カラム）に供した（図２）。その結果、生産されていた3-フェニル乳酸はD-3-フェニル乳酸と同一の保持時間を示し、L-3-フェニル乳酸とは異なるピークを与えた。このことより、W. fluorescens TK1菌株はエナンチオ選択的にD-3-フェニル乳酸を生産することが明らかとなった（図２）。

[0221] なお、図２（ａ）はD-3-フェニル乳酸及びL-3-フェニル乳酸の標品；（ｂ）は本菌株のMM培地培養後の上清；（ｃ）は本菌株のGPAMM培地培養後の上清；（ｄ）は本菌株から得られた酵素にてフェニルピルビン酸の基質を処理したものである。

[0222] （４）ＭＭ培地（最少培地）を用いてW. fluorescens TK1菌株で培養した際

のD-3-フェニル乳酸の生産性

W. fluorescens TK1菌株を初期菌体濃度を0.2（O.D.600）に合わせ、ＭＭ培地を用いて好気条件下で5日間振とう培養（羽根付きフラスコ、100 mL）し、経時的に培養上清をサンプリングした。その結果、菌体の増殖は培養開始24時間以降には定常期に入った。D-3-フェニル乳酸の生産量は定常期に入っても増え続け、培養開始96時間目には培地中に0.1 mMのD-3-フェニル乳酸を生産していた（図３）。

[0223] なお、図３～５の「Cell Density」は、菌体量を示し、「ＰＬＡ」はD-3-フェニル乳酸の濃度を示し、また「ＰＰＡ」はフェニルピルビン酸の濃度を示し、「Ｐｈｅ」はＬ－フェニルアラニンを示す。

[0224] （５）D-3-フェニル乳酸の生産に対するフェニルアラニンとフェニルピルビン酸の影響

W. fluorescens TK1菌株を初期菌体濃度を0.2（O.D.600）に合わせ、MM培地に、フェニルピルビン酸を添加したGPAMM培地（表４）と、L-フェニルアラニンを添加したGPMM培地（表５）をそれぞれ用いて好気条件下でそれぞれ2日間および3日間振とう培養（羽根付きフラスコ、100 mL）し、経時的に培養液をサンプリングし、本菌によるD-3-フェニル乳酸の生産量を測定した（図４及び５）。

[表4]

GPAMM medium	
D-Glucose	10.0 g
Phenylpyruvic acid	5.0 mM
$NaNO_3$	6.0 g
KCl	0.52 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.52 g
KH_2PO_4	1.52 g
*Hutner's trace elements per liter (pH 6.5)	2 ml

[表5]

GPMM medium		
D-Glucose		10.0 g
L-Phenyalanine		5.0 mM
$NaNO_3$		6.0 g
KCl		0.52 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$		0.52 g
KH_2PO_4		1.52 g
*Hutner's elements per liter (pH 6.5)	trace	2 ml

[0225] その結果、W. fluorescens TK1菌株は培地にL-フェニルアラニンを添加すると、添加しない際と比較して、菌体量は5.1倍となり、D-3-フェニル乳酸を57.5倍生産した。また、フェニルピルビン酸を添加すると菌体量は1.5倍となり、D-3-フェニル乳酸を8.9倍生産した。

[0226] 培地に5 mM のL-フェニルアラニンを添加した場合、培養24時間後にはL-フェニルアラニンは検出されなくなり、代わりに同レベル（5.7 mM）のD-3-フェニル乳酸が蓄積された。このことより、本菌によりL-フェニルアラニンがD-3-フェニル乳酸へと変換されたと考えられた。すなわち、本菌株は、光学活性フェニル乳酸を生成する酵素を有すると考えられた。

[0227] また、L-フェニルアラニンの減少とD-3-フェニル乳酸の生産に伴った菌体の増殖が見られた。L-フェニルアラニンを添加しているGPMM培地（図４）、L-フェニルアラニンを加えていないMM培地を用いた培養（図３）、フェニルピルビン酸を添加しているGPAMM培地（図４）を用いた培養での菌体の増殖量を比較すると、L-フェニルアラニンを添加しているGPMM培地を用いた培養で最も多かった。

[0228] これは、L-フェニルアラニンのアミノ基から遊離するアンモニアが窒素源として利用されるため本菌の増殖が促進されたためと考えられる。

[0229] （６）W. fluorescens ＴＫ１菌株が生産する酵素を含む無細胞抽出液の調製
湿菌体重量1.0 gあたり酸化アルミニウム2.5 gとプロテアーゼ阻害剤pheny

lmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、N-tosyl-L-phenylalanylchlormethyl ketone (TPCK) 各0.2 mM、10%グリセロールと1 mM dithiothreitol (DTT) を含んだ20 mMのリン酸緩衝液を加えて、菌体を乳棒と乳鉢を用いて破砕した。破砕液に菌体と同量の同緩衝液を加え、15000×gで遠心分離した。得られた培養上清を無細胞抽出液とした。以上の操作は氷中にて行った。

[0230] (7) 無細胞抽出液からの本酵素PPR回収条件の検討

フェニルピルビン酸のD-3-フェニル乳酸への還元を触媒する酵素(フェニルピルビン酸還元酵素)である本酵素PPRをW. fluorescens TK1菌株の無細胞抽出液から精製するのに先立って、本菌の本培養の培養時間と無細胞抽出液中のPPR活性の関係を検討した。GPMM培地を用いて培養開始4、12、48時間後の菌体より無細胞抽出液を調製したところ、培養時間12時間でのPPR活性が4時間、48時間に比べそれぞれ1.8、3.4倍高かった(図6)。

[0231] 以上の結果から、精製に用いる菌体は12時間培養したものを用いることとした。なお、培養開始12時間後は3-フェニル乳酸の生産が行われる時間と一致することから、本酵素PPRは3-フェニル乳酸の生産に関わっている可能性が示唆された。

[0232] (8) 本酵素PPRの至適pHの検討

pH 5.5～8のTris-HCl緩衝液(pH 7, 7.5, 8)、リン酸緩衝液(pH 5.5, 6, 6.5, 7)の各pH緩衝液を反応液に用いてPPR活性を測定し、本酵素PPRの反応の至適pHを検討した。pH 6.5で最も高いPPR活性が検出された(図7)。このことから、本酵素PPRの至適pHは6.5であり、以後の活性測定のpHは6.5で行った。

[0233] (9) W. fluorescens TK1菌株由来の本酵素PPRの調製

上述の如く、無細胞抽出液を調製し、この無細胞抽出液を100,000×gで1時間遠心分離した。

[0234] 更に、以下に示すように、遠心分離後の無細胞抽出液から、Butyl Sepharoseカラム、2'5'-ADP-Sepharoseカラム、次いでMonoQ HR 5/5カラムの各種クロマトグラフィーにて分離精製を行い、本酵素PPRを得た。

[0235] 〔Butyl Shepharoseカラム〕

遠心分離後の無細胞抽出液に、20%となるように硫安を添加した。wash buffer(10% glycerol, 1 mM dithiothreitol (DTT), 20 mMのリン酸緩衝液, 20% $(NH_4)_2SO_4$, pH7)をカラム容積の5倍量流しカラムの平衡化を行った。このカラムに調製したサンプルをのせ硫酸アンモニウムの直線濃度勾配（20%-0%）により溶出を行い、活性画分を得た。

[0236] 〔2’5’-ADP-Sepharoseカラム〕

上記で得られた活性画分を、透析buffer（10% glycerol, 1 mM DTT, 20 mMリン酸緩衝液, pH7）に対して一晩透析を行った。このサンプルを、wash buffer（10%glycerol, 1 mM DTT, 20 mMリン酸緩衝液, pH7）を5倍量流し平衡化を行った2’5’-ADP-Sepharoseカラムに供した。溶出はelution buffer（10% glycerol, 1 mM DTT, 0.1-1 mM $NADP^+$, 20 mMリン酸緩衝液, pH7）にて行い、活性画分を得た。

[0237] 〔MonoQ HR 5/5カラム〕

上記で得られた活性画分を、equilibration buffer（10% glycerol, 1 mM DTT, 20 mMリン酸緩衝液, pH7）で平衡化したMonoQ HR 5/5カラム（GE Healthcare）に供し、NaCl直線濃度勾配（0%-15%）により溶出を行った。

[0238] 〔PPR活性の測定法〕

PPRの活性測定は、酵素反応液として50 mM リン酸緩衝液（pH 6.5）、2 mM フェニルピルビン酸、0.1 mM NADPHを用い、これに試料（酵素液や無細胞抽出液など）を加えることにより反応を開始する。反応温度は25℃。活性は、反応に伴い生成されるNADPHの持つ340nmの波長の吸収の減少を紫外・可視分光時計（Beckman-Coulter DU-800）を用いて測定することによって定量する。NADPHの340 nm の波長の吸収のモル吸光係数は、6.2 $mM^{-1}・cm^{-1}$とする。

[0239] 〔Phenylalanine aminotransferase (PAT) の活性測定〕

PATの活性測定は、酵素反応液として50 mMリン酸緩衝液（pH 6.5）、10 mM L-フェニルアラニン、2.5 mM 2-オキソグルタル酸、12.5 μM Pridoxal phosphateを用い、これに試料（酵素液や無細胞抽出液など）を加えることによ

り反応を開始する。反応温度は37℃、反応時間30分とする。2 N NaOHを800 μL添加することで反応を終了させた。活性は、反応に伴い生成されるフェニルピルビン酸の持つ320 nmの波長の吸収の増加を測定することによって定量した。なおフェニルピルビン酸のモル吸光係数は17.5 mM^{-1}・cm^{-1}（Whitaker R J., et al. J. Biol. Chem.（1982）257, 3550-3556.）とする。

[0240] 〔PPRの分子量の定量〕

PPRの分子量の測定は、12.5%ポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGE及び／又はゲルろ過法により行う。

[0241] SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いる際には、Laemmliらの方法に従い、行う。

[0242] また、ゲル濾過法を用いる際には、polyethylene glycol 20,000を用いて濃縮した精製本酵素PPRサンプルなどを予めelution buffer（10% glycerol, 1 mM DTT, 20 mMリン酸緩衝液, 0.15 mM NaCl pH7）で平衡化させたSuperose 6 10/300に供し、カラム容量の1倍のelution bufferで溶出する。

[0243] 標準タンパク質として、牛血清アルブミン（M.W. 67,000）、キモトリプシノーゲン（M.W. 25,000）、α-アミラーゼ（M.W. 45,000）、β-アミラーゼ（M.W. 200,000）を用いる。

[0244] 菌体30 gより調製した無細胞抽出液中の総タンパク量は592.2 mgであり、D-3-フェニル乳酸の生産の総活性は190.8 μmol/mLであった。すなわち、フェニルピルビン酸還元酵素が無細胞抽出液中に存在することが確認できた。

[0245] これを遠心分離して得られた可溶性画分を、上述の如く、Butyl-Sepharose（疎水カラム）、2’5’-ADP-Sepharose（アフィニティーカラム）、Mono Q HR 5/5（強陰イオン交換カラム）に順次供した結果、本酵素PPRの比活性を2260倍まで濃縮でき、収率41%で本酵素PPRが精製できた（表６）。

[0246] 精製した本酵素PPRをSDS-PAGEに供した結果、単一バンドであることが示され、またその分子量は40,000であった（図８）。ゲル濾過法により、精製した本酵素PPR酵素の分子量は80,000と見積もられたことより本酵素PPRはホモ二量体を形成していることが明らかとなった（図８）。

[表6]

Purification summary of PPR from *Wickerhamia fluorescens* TK1

Purification procedure	Total protein (mg)	Total activity (μmol/min)	Specific activity(μmol/min/mg)	Yield(%)	Purification (fold)
Cell free extract	592.2	190.8	0.3	100	1
100000×g supernatant	514.2	233.0	0.5	122	1
Butyl-Sepharose	23.3	193.5	8.3	101	26
2'5'-ADP Sepharose	5.4	129.0	23.8	68	74
Mono Q HR 5/5	0.1	77.4	727.0	41	2260

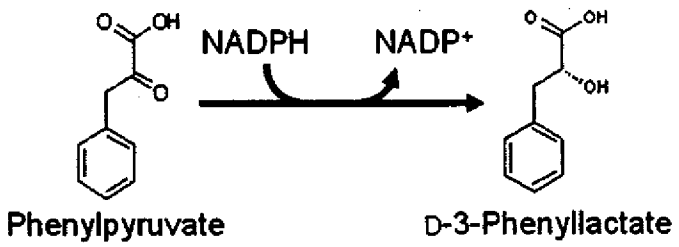
[0247] （１０）W. fluorescens ＴＫ１菌株由来の生成する酵素の諸性質

〔PPRの酵素学的解析〕

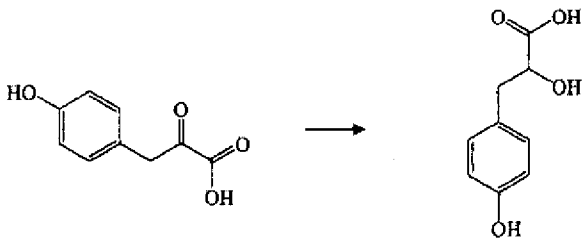
本酵素PPRはNADPH依存的に、フェニルピルビン酸と反応し、D-3-フェニル乳酸を生産することが、上述のHPLCの測定方法により確認できた。

[0248] また、2 mMのフェニルピルビン酸と2 mM のNADPHより、2 mMの3-フェニル乳酸が生産されることが確認されたことから、この反応には、以下の化学量論が成り立つことが示された(Scheme 1)。

[化2]



Scheme 1



(Scheme 2)

[0249] D-3-フェニル乳酸、L-3-フェニル乳酸、NAD^+、$NADP^+$の組み合わせを基質として用いた際の酵素反応は起きなかったことより、本酵素PPRによる反応は不可逆反応であることが示された。

[0250] また、本酵素PPRはNADPHを補酵素として利用してフェニルピルビン酸、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸、グリオキシル酸およびヒドロキシピルビン酸を還元した(Scheme 1及びScheme 2)。

[0251] このときkcat/Km値はフェニルピルビン酸を基質としたときに最も大きく、373 s^{-1} mM^{-1}であった（表７）。

[0252] また、NADHを補酵素とした際のkcat/Km値は330 $s^{-1}mM^{-1}$とNADPHを補酵素とした際（10143 $s^{-1}mM^{-1}$）の1/31という低い値になった。そのため本酵素は、補酵素としてNADHとNADPHを利用可能であるが、NADPHに対する特異性が高いことが示された。

[表7]

Kinetic properties of PPR

Variable substrate	Fixed substrate	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($s^{-1}mM^{-1}$)
Phenylpyruvate	NADPH	0.40±0.07	149±12	373
Glyoxylate	NADPH	18.9±5.8	18.9±3.4	1.00
Hydroxypyruvate	NADPH	3.46±0.83	9.14±0.70	2.64
Pyruvate	NADPH	ND[a]	ND	ND
Oxaloacetate	NADPH	ND	ND	ND
NADPH	Phenylpyruvate	0.01±0.00	121±2	10143
NADH	Phenylpyruvate	0.10±0.04	31.4±7.1	330

[a] Not detectable

[0253] 〔金属イオンと阻害剤の影響〕

各金属イオンと各阻害剤をそれぞれ終濃度1 mMで反応系に添加し、PPR活性を測定した。Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+}, WO^{2-}, Hg^{2+} の金属イオンにより、本酵素PPR活性の低下が見られたことから（表８）、これらがPPR活性を阻害することが示された。

[表8]

Effects of various compounds and detergents on the activity of PPR

Inhibitor	Relative activity[a] (%)
None	100
$MnCl_2$	103
$MgSO_4$	92
$CuSO_4$	0
$ZnSO_4$	9
$FeCl_2$	0
$CaCl_2$	90
$NiCl_2$	63
Na_2MoO_4	89
Na_2WO_4	0
$CoCl_2$	61
$HgCl_2$	0
Tween80[b]	52
TritonX-100[b]	82
EDTA	84
2-Mercaptethanol[b]	64

[a] Final concentration of the compounds was 1 mM unless otherwise stated.
[b] Final concentration were 0.5 %.

[0254] 〔D-3-フェニル乳酸生産菌及びそれの生産するPPRの諸性質〕

D-3-フェニル乳酸生産菌を検索した結果、子嚢菌酵母であるW. fluorescens TK1菌株が培養上清中にD-3-フェニル乳酸を0.1 mM生産していたことから、新規D-3-フェニル乳酸生産菌をスクリーニングすることができたと考えられた。また、L-フェニルアラニンを培地に添加し同様に培養した際のD-3-フェニル乳酸の生産量は5.7 mM生産していた。3-フェニル乳酸の生産の報告があるG. candidumではTSBYE培地を用いてジャーファーメンターを用いて培養することで3.6～6.0 mM（非特許文献２）、乳酸菌ではMRS培地を用いることで0.57 mM（J. Biochem. 2005 138, 741-74915)）の3-フェニル乳酸が生産されることが報告されている。また、Lactobacillus. Sp. SK007が3-フェニル乳

酸の前駆体であるフェニルピルビン酸を培地に6 mM添加した際に5.2 mMの3-フェニル乳酸を生産し（Li, X. et al., Biotechnol. Lett (2007) 29, 593-597,）、L. plantarum TMW1.468、L. sanfranciscensis DSM20451では培地に50 mMのフェニルアラニンを添加した場合0.04～0.08 mMの生産がみられた（Vermeulen, N. et al. J. Agric. Food Chem. (2006) 54, 3832- 3839）。以上の結果は、W. fluorescens TK1菌株がジャーファーメンターなどを用いて培養条件を精密にコントロールしなくて比較的高いD-3-フェニル乳酸を生産する能力をもつことを示しものである。

[0255] また、W. fluorescens TK1菌株はD-3-フェニル乳酸をエナンチオ選択的に生産していた。化成品、医薬品はサリドマイドに代表されるようにエナンチオマー同士で生理活性が異なることがある。そのため、キラル分子のエナンチオ選択的な製造が求められている。よって、本菌が高いエナンチオ選択性をもちD-3-フェニル乳酸を生産していることは、本化合物の医薬品原料などへの利用を考える上で大変意義があると考えられる。

[0256] また、精製した本菌のPPR活性は、フェニルピルビン酸を基質としたときのkcat/Km値が373 $s^{-1}mM^{-1}$であった。この値は、現在までに報告のあるいずれのLactobacillus pentosus JCM1558（非特許文献１５）、Lactobacillu. plantarum ATCC 8041のDLDH (Taguchi, H.; Ohta, T. J. Biol. Chem. (1991) 266, 12588- 12594)、Rhizobium etli CFN 42のGRHPR (Fauvart, M. et al. Biochimica et Biophysica Acta 1774 (2007) 1092-1098) の分子活性よりも高い値である（表９）。

[0257] また、これまでに唯一精製された真菌由来のフェニルピルビン酸を基質とする酵素であるCandida maltosa L4のD-4-hydroxyphenyllactate dehydrogenaseは、W. fluorescens TK1菌株のPPRと同様にフェニルピルビン酸と4-ヒドロキシフェニルピルビン酸に対して高い親和性を示している。しかし、D-4-hydroxyphenyllactate dehydrogenase はMn^{2+}を補因子として必要とし、分子量250,000-280,000と本菌PPRの分子量と比較すると非常に大きい。また、本酵素PPRがフェニルピルビン酸に対する親和性が最も高かったのに対して、D-4-

hydroxyphenyllactate dehydrogenaseは4-ヒドロキシフェニルピルビン酸に対する親和性の方が高かったことからも、両者は別の酵素であることが考えられる。

[表9]

Substrate specificities for phenylpyruvate of *W. fluorescens* TK1 and other organisms.

Strain	PPA (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($s^{-1}mM^{-1}$)
W. fluorescens TK1	0.4	149	373
Lactobacillus pentosus JCM1558	0.8	40	50
Lactobacillus planarum SK002	20	22	1.1
Rhizobium etli CFN 42	0.8	0.37	0.46

非特許文献１５

Taguchi, H.; Ohta, T. J. Biol. Chem. (1991) 266, 12588- 12594

Fauvart, M. et al. Biochimica et Biophysica Acta 1774 (2007) 1092-1098

[0258] ＜実施例２＞pprの遺伝子のクローニング及び大腸菌での発現

（１）使用菌株

3-フェニル乳酸生産菌W. fluorescens TK1菌株を用いた。

[0259] E. coli Origami B (DE3)を、PPR発現用の宿主として用いた。プラスミドの構築に際しては、E. coli JM109 株を用いた。

[0260] （２）培養方法

全容50 mLの試験管に分注した上述のYPD培地10 mLに、予め菌体を生育させたYPD寒天培地から、菌体を一白金耳植菌し、30℃で2日間、120 rpmで振とう培養した。前培養液から菌体を遠心分離により集菌し、その沈殿を生理食塩水で洗浄した。これを150 mLのGPMM培地を含む全容500 mLの羽根つきフラスコに植菌した。これを30℃、12時間、120 rpm、好気条件下で振とう培養した。

[0261] （３）本酵素PPRのＮ末端アミノ酸配列解析

〔ブロッティング〕

濾紙をA溶液（0.3 M Tris、5%メタノール）に2枚、B溶液（25 mM Tris、5%メタノール）に1枚、C溶液（25 mM Tris、40mM 6-アミノカプロン酸、5%メ

タノール）に3枚それぞれ浸した。精製した本酵素PPRをSDS-PAGEで電気泳動した後、ゲルをそれぞれの溶液に浸した濾紙を重ね、転写装置（ホライズブロットAE - 6670P/N、ATTO）を用いて電気的にPolyVinylidene DiFluoride（PVDF）膜（AE-6665、ATTO）に転写した。

[0262] 〔プロテインシーケンス〕

乾燥させたPVDF膜より目的のバンドを切り出し、アミノ酸配列分析装置（Applied Biosystems Procise 492 cLC）に供した。

[0263] （４）本酵素PPRの内部アミノ酸配列の決定

SDS-PAGEに泳動した精製した本酵素PPRをゲルより切り出し、トリプシンによりゲル内消化した。トリプシン消化ペプチドをMatrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of Flight（MALDI-TOF/MS）（AXIMA（登録商標），AXIMA（登録商標）-QIT Shimazu)に供し、得られたフラグメント情報を基にアミノ酸配列を決定した。

[0264] （５）cDNAの調製

GPMM培地で培養したW. fluorescens TK1菌株を破砕バッファー（500 mM NaCl, 200 mM Tris-HCl（pH7.5), 10 mM EDTA, 1% SDS）に懸濁し、半量のガラスビーズと等量のフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール（25:24:1）を加えた（フェノクロ処理）。ボルテックスで攪拌したのち遠心分離し、上清を回収し、DNase処理し、フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール抽出を2回繰り返して、2.5倍量のエタノールと1/10倍量の3 M酢酸ナトリウムを添加した（エタノール沈殿）。遠心分離後、沈殿をRLC（RNeasy（登録商標） Plant Mini Kitに付属のもの）450 μL、2-メルカプトエタノール4.5 μLに懸濁した 。以降のステップは RNeasy（登録商標） Plant Mini Kitのプロトコルに従った。調整したRNAとPrimeScript（登録商標）Reverse Transcriptaseを用いてcDNAを合成した。

[0265] （６）全DNAの調製

YPD培地で一夜培養したW. fluorescens TK1菌株を破砕バッファー（100 mM NaCl、10 mM Tris-HCl（pH8.0)、1 mM EDTA、2% TritonX-100）に懸濁し、

半量のガラスビーズと等量のフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール（25:24:1）を加えた（フェノクロ処理）。ボルテックスで攪拌したのち遠心分離し、上清を回収し、フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール抽出を2回繰り返して、2.5倍量のエタノールと1/10倍量の3 M酢酸ナトリウムを添加した（エタノール沈殿）。遠心分離後、沈殿を70%エタノールで洗浄した。70%エタノールを捨てアスピレータで乾燥させ、RNaseを加えた適量の滅菌水に懸濁した。

[0266] （７）クローニング

〔ＰＣＲ法〕

50 μLのPCR反応系に、得られたcDNAを鋳型として1 μL、10×KOD -Plus-buffer(TOYOBO) 5 μL、各2.5 mM dNTP 4 μL、プライマーNP（5'-ATGAARAARCCNCAGGT-3'）（配列番号１０）、Oligo dT （5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'）（配列番号１１）、KOD -Plus- DNA Polymerase(TOYOBO) 1 μL、25 mM MgSO4 2 μLを加えた。この反応系に対して、96℃ 30 s、50℃ 30 s、68℃ 3 minの処理を35回行った後、68℃ 5 min伸長反応させた（一次PCR）。さらに、PCR産物をテンプレート1 μL、10×Ex Taq buffer(TaKaRa) 5 μL、各2.5 mM dNTP 4 μL、プライマーNP（配列番号１０）、プライマー2427P（5'-GGYTCYTCYTCRAANACRTT-3'）（配列番号１２）、Ex Taq Polymerase (TaKaRa) 0.5 μLを加えた。96℃ 15 s、56℃ 20 s、72℃ 1 minの処理を35回行い、72℃ 5 min伸長反応させた（二次PCR）。

[0267] 〔PPR遺伝子の全長解析〕

調製した全RNAをもとに、5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE), Version 2.0 (Invitrogen Co., CA)を用いてPPRの5'-末端のcDNAを合成した。得られたcDNAをテンプレートとして、kit付属のアダプターオリゴヌクレオチドとPPRをコードする遺伝子に特異的なプライマー(GSP1(5'-TGAAAATGCGTTAGTATGTGGAT-3'） （配列番号１３）、GSP2（5'-TGCCTTTGCTGCTTTGAATGTAT-3'）（配列番号１４））を用いてnested PCRした。PCRの反応条件は、96℃ 15 s、56℃ 20 s、72℃ 1 minの処理を35回行い、72℃ 5 mi

n伸長反応させた。PCRで得られた200 kpのDNA断片をアガロース電気泳動により回収し、pGEM(登録商標)-T easy (Promega, Madison, WI)にクローニングした。得られたプラスミドの挿入断片のDNA配列を決定した。

[0268] 3'-末端は3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Invitrogen Co., CA)により合成したcDNAをテンプレートとして、プライマーGSP(5'-AACTACGAGGTGCTGCC-3')（配列番号１５）、プライマーGSP nest (5'-GTCCTCCCCAGTTACCATATATAGC-3')（配列番号１６）を用いて上記と同様にPCRを行い、得られた270 kbの断片の塩基配列を決定した。

[0269] 〔DNA配列解析〕

DNAの配列解析は全自動 DNAシーケンサー (CEQ2000, Beckman Coulter) を用いて解析した。方法は、プロトコルに従って行った。

[0270] （８）リアルタイムPCR

W. fluorescens TK1菌株を、MM培地、GPMM培地、GPAMM培地を用いて30℃、8時間培養し、得られた各培地の菌体からRNAを調製した。これを鋳型としてoligo-dT19プライマー、Reverse Transcriptase M-MLV (TAKARA BIO, Inc., Japan)を用いて逆転写反応を行った。得られた一本鎖cDNAを鋳型として、iQ（登録商標） SYBR（登録商標） Green Supermix (Bio-Rad Laboratories Inc., CA)を用いてMiniOpticon（登録商標）version 3.1 (Bio-Rad Laboratories Inc., CA)に供した。それぞれの菌体でpprA遺伝子の発現量を、18S ribosomal RNAの発現量との比として表した。

[0271] 発現の比率 (pprA /18SrDNA) ＝$2^{CT(pprA)-CT(18S\ ribosom)}$

＊C_Tは増幅産物が蓄積し、検出可能な蛍光シグナルが得られたサイクル数。

[0272] なお、用いた酵素pprA (pprART F (5'-ATTTAGCCGCGATGAAAGAAC-3')（配列番号１７）、pprART R (5'-TCGGCAAAGGCACATCC-3')（配列番号１８））および18S ribosomeのプライマー (18SRT F (5'-ACCAGGTCCAGACACAATAAGG-3')（配列番号１９）、18SRT R (5'-AAGCAGACAAATCACTCCACC-3')（配列番号２０））はプライマー作製ソフトprimer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi)を用いて設計した。

[0273] （９）大腸菌を用いた組換えPPR（rPPR）の発現、精製

〔形質転換体の作製〕

W. fluorescens TK1菌株のRNAから調製した一本鎖cDNAとプライマーNde-PPR（5'-GGGTTTCATATGAAAAAGCCTCAG-3'）（配列番号２１）、Xho-PPR（5'-CCGCTCGAGAACTACAAGATT-3'）（配列番号２２）を用いて、PCR反応によりpprA遺伝子のcDNA断片を増幅した。これをNdeI, XhoＩで処理したものをpCWoriを予め同じ制限酵素で処理したものに連結して構築したプラスミド（pCW-PPR）をE. coli ATCC31882（ATCCより取得）に導入した（図９及び図１０参照）。

[0274] 〔発現の誘導〕

得られた組換え体を終濃度100 μg/L アンピシリンナトリウムを含んだLB培地(LA) 10 mLで37℃、12 時間前培養した。この全量を150 mL LAに植菌した。120 rpm, 37℃、2時間培養後、終濃度1 mMのIPTGを添加し、50 rpm、室温で8時間培養した。

[0275] 〔rPPRの精製〕

培養した菌体を集菌し、buffer A (20 mM potassium phosphate (pH 7.0), 10% glycerol, 0.1 mM DTT)に懸濁して、超音波破砕した。破砕液を15,000 rpm, 30 分間遠心分離して上清(無細胞抽出液)を回収した。予めNi^{2+}を吸着させた後、300 mM NaClを含んだbuffer A (buffer C)で平衡化したchelating Sepharose column (Amersham)に無細胞抽出液を供した。500 mM imidazoleを含んだbuffer Cで溶出した画分を回収し、buffer Aに対して透析し、以降の解析に用いた。

[0276] （１０）分子系統解析

〔アミノ酸配列のアライメント〕

クローニングしたpprA遺伝子の推定アミノ酸配列と相同性のある配列をNational Center for Biotechnology Information (NCBI) のデータベース内で検索した。この際、BLASTを用いた。得られた配列情報を利用してClustalWによるマルチプルアライメント解析を行った。

[0277] 〔系統樹の作成〕

系統樹の作成にはMEGA 4を用いた。系統樹の作製に用いたアミノ酸配列はNCBIより入手した。系統樹の作成は近隣接合法により行い、枝上にブートストラップ反復推定値を示した。

[0278] （１１）本酵素PPRのN末端アミノ酸配列の決定

精製した本酵素PPR（1μg）をPVDF膜に電気的にブロッティングし、本酵素PPRのN末端のアミノ酸配列を分析した。その結果、MKKPOVLILGRIからなる本酵素PPRの12残基のN末端アミノ酸配列を決定することができた（配列番号１）。

[0279] （１２）本酵素PPRの内部アミノ酸配列の取得

SDS-PAGE後の本酵素PPRをゲルより切り出し、トリプシンを用いてゲル内消化を行った。得られたトリプシン消化ペプチドをMALDI-TOF MS解析した。MALDI-TOF MS解析により得られたペプチドピーク中から、m/z 2000.00とm/z 2427.27の二つのペプチドを選び、MALDI-QIT-TOF MSを用いたMS/MS解析を行った（図１１）。得られた質量フラグメントピークの情報をもとにトリプシン消化ペプチドのアミノ酸配列のde novoシーケンスを行った結果、m/z 2000.00を示すペプチドは19アミノ酸残基からなるNIQAIYGNWGGLASFGGFKのアミノ酸配列（配列番号２）、m/z 2427.27を示すペプチドは22アミノ酸残基からなるVAFAALDVFEEEPFIHPGLIGRのアミノ酸配列（配列番号３）をそれぞれ得ることができた（図１２）。

[0280] （１３）pprA遺伝子のクローニング

N末端アミノ酸配列（配列番号１）と内部アミノ酸配列m/z 2427.27（配列番号３）の情報を基に、プライマーNP（配列番号１０）、プライマー2427P（配列番号１２）をそれぞれ設計した。W. fluorescens TK1菌株より調製したcDNAを鋳型とし、プライマーNP（配列番号１０）、プライマーOligo dT（配列番号１１）を用いてPCRを行った。さらに、PCR産物を鋳型として、プライマーNP（配列番号１０）、プライマー2427P（配列番号１２）を用いてPCRを行った。その結果、935 bpの目的のDNA断片が増幅された（図１３）。

[0281] 増幅されたDNAの塩基配列をもとにプライマーを設計し、RACE法によりpprA

遺伝子の両末端の塩基配列を解析した。その結果、pprA遺伝子は364残基のアミノ酸をコードする1,095 bpの塩基対からなることが示された（図１４：配列番号４及び５）。この推定アミノ酸配列中には、上記で決定したPPRのN末端および内部アミノ酸配列をともに見出すことができた。また、ゲノムDNAより増幅した配列とcDNAより増幅した配列とを比較したところ、pprA遺伝子にはイントロンが存在しないことが明らかとなった。

[0282] （１４）pprA遺伝子の染色体上でのコピー数

W. fluorescens TK1菌株のゲノム上に存在するpprA遺伝子のコピー数を確認するためにサザンブロット解析を行った（図１５）。制限酵素（HindIII、EcoRI、PstI、BamHI）で処理したW. fluorescens TK1菌株の全DNAに対して、pprA遺伝子の配列を含むDNA断片をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、いずれの制限酵素処理した全DNAを用いた場合でもバンドは一本のみ検出された。このことより、ゲノム上に存在するpprA遺伝子は1コピーのみであり、精製した本酵素PPRはpprA遺伝子が発現したものであることが示された。

[0283] （１５）L-フェニルアラニンによる本酵素PPRの発現制御

GPMM培地（D-グルコース及びL-フェニルアラニンを含む）、GPAMM培地（D-グルコース及びフェニルピルビン酸を含む）、MM培地（D-グルコースを含む）をそれぞれ用いてW. fluorescens TK1菌株を10時間、30℃でそれぞれ培養して得られた菌体の無細胞抽出液中のPPR活性を上述の〔PPR活性の測定法〕に従って測定した。その結果、L-フェニルアラニンを添加したGPMM培地を用いて得られた菌体の無細胞抽出液中のPPR活性は0.22 μmol/min/mgであり、MM培地を用いて培養した際の活性に比べ3.6倍であった。また、フェニルピルビン酸を添加したGPAMM培地を用いた際のそれと比べ3.0倍高かった（図１６）。同様の条件下でW. fluorescens TK1菌株を8時間培養して得られた菌体のpprA遺伝子の転写量をリアルタイムPCRを用いて測定した。その結果、5 mMフェニルアラニンを添加したGPMM培地を用いて培養した菌体でのpprA遺伝子の発現量がMM培地を用いた条件に比べ40倍、GPAMM培地を用いて培養した条件に

比べ18倍増加していた（図１６）。以上の結果から、pprA遺伝子の発現は、フェニルアラニンによって誘導されることが示された。

[0284] （１６）大腸菌を用いた酵素rPPRの発現、精製

〔酵素rPPRの精製〕

大腸菌Origami B株にpET21aにpprA遺伝子のcDNAを組込んだプラスミドを導入した。N末端にHisを付加させた本酵素PPRを発現させた後、chelating Sepharoseカラムを用いて精製した(図１７)。その結果、40 kDaに単一バンドが得られたことから、酵素rPPRを精製できたことが示された。

[0285] 〔酵素rPPRの酵素学的諸性質〕

精製した酵素rPPRはW. fluorescens TK1菌株の酵素PPRと同様に、NADPHを補酵素として利用可能であり、フェニルピルビン酸、４－ヒドロキシフェニルピルビン酸、グリオキシル酸およびヒドロキシピルビン酸を基質とした際のkcat/Km値はフェニルピルビン酸を基質としたときが最も高かった（表１０）。また、ピルビン酸とオキサロ酢酸を基質とした活性は検出されなかった（データ示さず）。これらのことより、大腸菌を用いて発現させた酵素rPPRも、W. fluorescens TK1菌株由来の酵素PPRと同様の基質特異性を示すことが明らかとなった。

[表10]

Kinetic properties of rPPR

Variable substrate	Fixed substrate	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($s^{-1}mM^{-1}$)
Phenylpyruvate	NADPH	0.57±0.13	177±23	313
Glyoxylate	NADPH	25.2±3.1	10.4±0.8	0.41
Hydroxypyruvate	NADPH	6.99±2.74	6.63±1.04	0.95
NADPH	Phenylpyruvate	0.02±0.07	148±19	7200

[0286] （１７）本酵素PPRの分子系統解析

〔酵素PPRのアライメント解析〕

酵素PPRの推定アミノ酸配列は、相同性が最も高かったCandida dubliniensis の機能未知遺伝子の推定アミノ酸配列と54%の相同性しか示さなかった。また、機能が明らかとなっているタンパク質のアミノ酸配列ではL. plantar

um 由来のD-lactate dehydrogenase (DLDH) と20%、R. etli CFN 42の組換えGRHPRと25%、Solenostemon scutellarioide由来のhydroxyphenylpyruvate reductase (HPPR) と27%の相同性を示したのみであった。

[0287] C. dubliniensisの機能未知遺伝子、L. plantarum由来のDLDH、R. etli CFN 42の組換えGRHPR、S. scutellarioide由来のHPPRおよびW. fluorescens TK1菌株の推定アミノ酸配列を用いてアライメント解析を行った。

[0288] W. fluorescens TK1菌株の推定アミノ酸配列上の185-331番目にはNADH/NADPH結合ドメインが見られた。さらにNADH/NADPH結合モチーフと思われる配列-G-X-G-X-X-G-がPPRの推定アミノ酸配列に見られた（図１８）。また、ヒト由来GRHPR (Booth MP, et al. J Mol Biol. (2006) 360, 178-189.)) の基質結合部位として同定されている基質のカルボキシル基の酸素原子と水素結合する86番目のバリン (V) (V83 in GRHPR)、87番目のグリシン (G) (GRHPR: G274)、基質のカルボキシル基とカルボニル基の酸素原子と水素結合する282番目のアルギニン (R) (GRHPR: R269) 残基が酵素PPRに保存されていた。酸塩基触媒である329番目のヒスチジン (H) (GRHPR: H329) 残基とH329残基のイミダゾール環と水素結合する311番目のグルタミン酸 (E) (GRHPR: E311) 残基も保存されていた。DLDHとGRHPRはD-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase superfamilyに属する酵素であることから、本供試菌のPPRも同ファミリーに属することが示唆された。

[0289] 〔系統樹〕

GRHPR、HPPR、DLDH、formate dehydrogenase(FDH)、L-lactate dehydrogenase(LLDH)およびmalate dehydrogenase(MDH)ファミリーに属する既知の酵素と、本酵素PPRと相同性の高かった機能未知タンパク質のアミノ酸配列を選抜し、分子系統樹を作製した。その結果、PPRはLLDH、MDH superfamily とは異なるクラスターに属しておりD-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase superfamilyに分類された。

[0290] さらに詳細な系統解析を行うために、D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase superfamilyに属するHPPRまたはGRHPRファミリーに属する酵素

と、本酵素PPRおよび本酵素PPRと、相同性を示した機能未知タンパク質のアミノ酸配列を選び、系統樹を作製した。その結果、本菌のPPRは既存のHPPRまたはGRHPRファミリーには属しておらず、子嚢菌酵母の機能未知タンパク質と新たなクラスターを形成していた。このことより、PPRはD-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase superfamilyに属する新規ファミリーを形成することが明らかとなった。そのファミリーは系統樹上でHPPRとGRHPRファミリーの近隣に位置しており、このことは本酵素PPRが、HPPRまたはGRHPRファミリーの酵素と同様にフェニルピルビン酸、４－ヒドロキシフェニルピルビン酸、グリオキシル酸およびヒドロキシピルビン酸を基質として認識するという点と相関を示した。

[0291] 〔本酵素PPRの機能性〕

本研究において、D-3-フェニル乳酸及び光学活性４－ヒドロキシフェニル乳酸を生産可能な子嚢菌酵母W. fluorescens TK1菌株を新たに見出した。さらに供試菌よりD-3-フェニル乳酸及びD-4-ヒドロキシフェニル乳酸の生産に関与する本酵素PPRを精製し、その遺伝子であるpprA遺伝子をクローニングした。今までにD-3-フェニル乳酸及びD-4-ヒドロキシフェニル乳酸の生産に直接関わる酵素を精製し、その遺伝子をクローニングしたという報告はなく、本研究は初めての例である。また、本酵素PPRは3-フェニル乳酸の生産に関与しているとして報告のあった乳酸菌のDLDHとは酵素学的解析、分子系統解析のいずれの結果からも異なる酵素であることが示された。系統解析より、本酵素PPRはD-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase superfamilyの既存のファミリーには分類されず、子嚢菌酵母の機能未知タンパク質と同じグループにマッピングされた。このことより、本酵素PPRはD-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase superfamilyに属する新規酵素であり、その機能は子嚢菌酵母に保存されている可能性が示唆された。

[0292] 本研究により明らかにされたW. fluorescens TK1菌株におけるD-3-フェニル乳酸の生産機構のモデルを図１９に示す。グルコースを炭素源とした場合にはシキミ酸経路により供給されるフェニルピルビン酸が本酵素PPRにより還

元されD-3-フェニル乳酸が生成すると考えられた。また、フェニルアラニンを培地に添加した場合は、フェニルアラニンはアミノトランスフェラーゼによりアミノ基の脱離がされフェニルピルビン酸へと変換される。さらに、本酵素PPRによりフェニルピルビン酸よりNADPHを補酵素として還元的にD-3-フェニル乳酸が生産される。また、pprA遺伝子はフェニルアラニンの存在下で転写レベルでの発現量が増大していた。実際にタンパク質レベルでもPPR活性は3.6倍、D-3-フェニル乳酸の生産量もフェニルアラニン添加時では添加してないときと比較して58倍まで増加した。

[0293] 乳酸菌における3-フェニル乳酸の生産は、ピルビン酸から乳酸へと変換を触媒するLDHがフェニルアラニンの代謝中間体であるフェニルピルビン酸にも触媒作用を示したため副次的に生産されると考えられている（Valerio F. et al., (2004) FEMS Microbiol Letters, 233, 289-295）。しかし、本供試菌の本酵素PPRはLDH活性を示しておらず、基質として認識する2-ケト酸の中でフェニルピルビン酸に対しての親和性が最も高かった。これは、本酵素PPRの機能が通常の乳酸菌のLDHとは異なることを示す。

[0294] また、本酵素PPRは、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸からD-4-ヒドロキシフェニル乳酸を生成することが明らかとなった。

[0295] このことより、本供試菌では、3-フェニル乳酸及びD-4-ヒドロキシフェニル乳酸の生産は副次的なものではなく、本酵素PPRによって特異的に生産されていたことが分かる。

[0296] 本研究では、大腸菌のpETシステムを利用することによって組換えPPRの発現と精製に成功した。

[0297] また、本研究により、芳香族化合物の生合成に関する新規な酵素PPRの精製、その遺伝子のクローニングと異種生物での発現系を構築することに成功した。この成果は、今後の芳香族系化合物の発酵生産のために役立つと考えられる。3-フェニル乳酸は幅広い抗菌活性を示す抗菌物質であるが、それと同時に芳香族系ポリマーの素材としての可能性も期待されている（Tsuji H. et al., J. Appl. Polymer Sci., 110, 3954-3962 (2008)）。芳香族系ポリマ

ーはベークライトに代表されるフェノール樹脂やポリフェニレンオキシドがあり、一般的に耐熱性、耐薬品性などの優れた物性がある。

[0298] しかし、その原料の供給は主に石油由来であり、循環型社会が叫ばれる現在では、バイオマス由来の原料への変換が求められている。現在までに、バイオポリマーとして実用化が検討されているものの主流はポリ乳酸であろう。ポリ乳酸は原料である乳酸をラクチド重合や直接重合により得られる（Yin, M.; Baker, G. L. Macromolecules 1999, 32, 7711.）。ポリ乳酸の実用化が進んでいる理由としては、原料である乳酸が代謝の基幹産物であり、乳酸菌による乳酸発酵といったバイオベースでの生産の研究がよくなされているからである。もし、芳香族系の代謝産物の発酵生産技術が確立されれば、安定的な原料の供給が可能となりバイオマス由来の芳香族系ポリマーの製造が可能となると考えられる。本研究によりD-3-フェニル乳酸の生産機構を解明したことにより、今まで研究が困難であったD-3-フェニル乳酸を用いたバイオポリマーの機能解明のためのブレイクスルーとなると考えられる。

[0299] ＜実施例３＞D-3-フェニル乳酸生産システムの構築

（１）pprの遺伝子を導入したフェニルアラニン生産性大腸菌の調製

D-3-フェニル乳酸の生産株は、LB培地{10.0 g/L tryptone、5.0 g/L yeast extract、10.0 g/L NaCl}で一晩培養した後に、滅菌したグリセロールを全量の20%添加し、-80℃で保存した。

[0300] 前培養は、試験管に5.0 mLのLB培地を入れ、培地に対し1/100量のグリセロール保存溶液を接種して、37℃、120 rpmで約6時間振とう培養した。

[0301] はじめに、フェニルアラニン生産性であるATCC31882株（ATCCより入手）に、上述の手法に準じてプラスミドを作製し、これを用いてpprの遺伝子を導入し、形質転換した新規フェニル乳酸生産株を調製した。

[0302] （２）新規フェニル乳酸生産株による培養

本フェニル乳酸生産株を、50 mLのフェニル乳酸生産培地（表１１及び１２）に20 g/Lのグルコースと50 mg/Lのカナマイシンを加えたものを用いて、1/100量の前述した前培養液を接種し、500 mL容羽根付き三角フラスコで、37℃

、120 rpm、24時間振とう培養した。

[表11]

フェニル乳酸生産培地組成（pH6.5）
12.0 g/L Na_2HPO_4
6.0 g/L KH_2PO_4
0.50 g/L NaCl
1.00 g/L NH_4Cl
0.30 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
0.015 g/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$
0.015 g/L Thiamine HCl
10.0 g/L Tryptone
5.00 g/L Yeast extract
2.00 ml /L trace element 2 solution

[表12]

trace element 2 solution
4.00 g $ZnSO4 \cdot 7H_2O$
1.10 g H_3BO_3
0.50 g $MnCl \cdot 4H_2O$
1.00 g/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$
0.16 g/L $CoCl_2 \cdot 6H_2O$
0.16 g/L $CuSO_4 \cdot 5H_2O$
0.11 g/L $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$
5.00 g/L EDTA(2Na)
in 100ml distilled water

[0303] その結果を図２０および表１３に示した。なお、D-3-フェニル乳酸およびL-フェニルアラニンの定量は、RP-18カラム（MERCK社製）を用い、HPLC（HEWLETT PACKARD社製 SERIES1100）で行った。

[0304] フェニル乳酸の光学活性は、培地中のフェニル乳酸を再結晶法により精製し、そのサンプルを上述の如くNUCLEOSIL Chiral-1カラム（MACHEREY-NAGEL社製）に供して決定した。

[0305] D-グルコースの定量は、グルコースＣＩＩテストキット（Wako社製）を用いて行った。

[0306] pprA遺伝子をフェニルアラニン生産株であるATCC31882株にそれぞれ導入することによって、99%以上D-3-フェニル乳酸をそれぞれ生産する有用株（ATCC 31882 /pHSGpprA）を作製することに成功した。

[0307] 続いて実用化を目指し、ATCC31882 pHSGpprA株を用いて、ジャーファーメンターによるD-3-フェニル乳酸生産を行った（図２１）。

[0308] 400 mLの前述したフェニル乳酸生産培地を1.0 L容ジャーファーメンターに入れ、1/100量の前培養液を接種し、37℃、500 rpm、0.2 L/min (0.5 vvm)の空気を通気し、さらに、5NのNaOHを用いてpHを7.0に制御して、96時間培養した。培養環境の安定化のために、適量の消泡剤を加えた。

[0309] なお、炭素源であるD-グルコースは、ペリシターポンプを用いて、500 g/LのD-グルコース溶液を1.50 g/L/hの速度になるように培地中へ添加した。

[0310] また、栄養要求成分であるL-チロシンとL-トリプトファンは、長期培養による欠乏を防ぐために、予めフェニル乳酸生産培地にそれぞれ0.50 g/L添加した。

[0311] 最終的に、培養96時間でD-3-フェニル乳酸を15.5 g/L（対糖収率10.8%）生産することができた。なお、対糖収率は、D-3-フェニル乳酸の生成量（ｇ）／D-グルコースの総添加量（ｇ）にて算出した。

[表13]

菌株	菌体濃度 (O. D.)	フェニル乳酸生産量 (g/L)	フェニルアラニン生産量 (g/L)	対糖収率 (g-フェニル乳酸/g-グルコース)
Escherichia coli K12	8.28	n. d.	0.30	
ATCC31882 株	10.42	0.09	1.24	0.004
ATCC31882/pHSG-*pprA*	9.89	2.43	0.30	0.121

[0312] （４）生産されたD-3-フェニル乳酸の精製

培地中に生産されたD-フェニル乳酸は、有機溶媒を用いた抽出法と再結晶法を用いて精製された。抽出溶媒は、メタノールとヘキサンの混合溶媒（混合比1:1）を用いた。

[0313] まず、遠心分離して菌体を除去した培養上清に塩酸を加えて酸性化し、それに抽出溶媒を等量加え、30分間緩やかに攪拌し、抽出作業を行った。

[0314] その後、有機溶媒層を回収し、培養液に再度新しい抽出溶媒を加え、前述の工程を行った。これらの工程を２回行い、回収した有機溶媒層をエバポレートにより蒸発乾固し、D-3-フェニル乳酸を含有する粉末固体を得た。

[0315] 得られた粉末固体から高純度のD-3-フェニル乳酸を得るために、トルエンを加え、90～100℃で粉末を十分に溶解させ、その後、ゆっくり冷却させることでトルエン溶液中に白色結晶を得ることができた。

[0316] トルエンを除き、洗浄した白色結晶をキラルカラムとGC/MS（GC-2010 SHIMADZU社製）に供した結果、白色結晶が高純度のD体の3-フェニル乳酸であることが確認された。

[0317] 以上、本発明のPPRを用いることによって、光学活性D-3-フェニル乳酸の発酵生産を行い、生産物であるD-3-フェニル乳酸を高純度に得られる技術が確立された。また、その生産量も既報に比べて格段に多く、次項の産業用途にとって有益である。

[0318] ＜実施例４＞PPRをコードする遺伝子を利用した光学活性4-ヒドロキシフェニル乳酸生産システムの構築

（１）pprA遺伝子を導入したＬ－チロシン生産性大腸菌の調製

光学活性4-ヒドロキシフェニル乳酸の生産株は、LB培地{10.0 g/L tryptone、5.0 g/L yeast extract、10.0 g/L NaCl}で一晩培養した後に、滅菌したグリセロールを全量の20% 添加し、-80℃で保存した。

[0319] 前培養は、試験管に5.0 mLのLB培地を入れ、培地に対し1/100量のグリセロール保存溶液を接種して、37℃、120 rpmで約6時間振とう培養した。

[0320] はじめに、フェニルアラニン生産性であるATCC31882株（ATCCより入手）に、上述の手法に準じてプラスミドpTyrAを作製し（図２２）、これを用いて配列番号２４に示す塩基配列の779塩基目のCをTに変えることによって260番目のThrをIleに置換させたtyrA遺伝子（配列番号２３）を導入し、L-チロシン生産菌を得た。このL-チロシン生産菌に、上述の手法に準じてプラスミド（pCWpprA又はpHSGpprA）を作製し、これを用いて更にppr遺伝子を導入し、形質転換した新規光学活性ヒドロキシフェニル乳酸生産株（NST-pprA生産株）を

調製した。

[0321] （２）PPRを有する新規光学活性ヒドロキシフェニル乳酸生産株の培養

PPRを有する光学活性ヒドロキシフェニル乳酸生産株を、50 mLのD-ヒドロキシフェニル乳酸生産培地（表１４及び表１５）に20 g/Lのグルコースと50 mg/Lのカナマイシンを加えたものを用いて、1/100量の前述した前培養液を接種し、500 mL容羽根付き三角フラスコで、37℃、120 rpm、24時間振とう培養した。

[0322] 得られた形質転換体をグルコースを炭素源とした培地を用いて培養したときに、培地中に4-ヒドロキシフェニル乳酸が検出された。生産される4-ヒドロキシフェニル乳酸はD-4-ヒドロキシフェニル乳酸であった。現在までに、２．５ g/LのD-4-ヒドロキシフェニル乳酸の発酵生産（対糖収率８％）が可能となった（表１６）。

[表14]

4-ヒドロキシフェニル乳酸生産培地組成（pH6.5）
12.0 g/L Na_2HPO_4
6.0 g/L KH_2PO_4
0.50 g/L NaCl
1.00 g/L NH_4Cl
0.30 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
0.015 g/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$
0.015 g/L Thiamine HCl
10.0 g/L Tryptone
5.00 g/L Yeast extract
2.00 ml /L trace element 2 solution

[表15]

trace element 2 solution
4.00 g $ZnSO4 \cdot 7H_2O$
1.10 g H_3BO_3
0.50 g $MnCl \cdot 4H_2O$
1.00 g/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$
0.16 g/L $CoCl_2 \cdot 6H_2O$
0.16 g/L $CuSO_4 \cdot 5H_2O$
0.11 g/L $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$
5.00 g/L EDTA(2Na)
in 100ml distilled water

[表16]

菌株	菌体濃度 (O. D.)	D-ヒドロキシフェニル乳酸生産量 (g/L)	対糖収率 (g-ヒドロキシフェニル乳酸/g-グルコース)
Escherichia coli K12	6.1	n. d.	
ATCC31882株/pTyrA	6.0	n. d.	
ATCC31882/pTyrA /pHSGpprA	5.4	2.5	0.08

[0323] （３）PPRをコードする遺伝子を含む微生物が生産した光学活性4-ヒドロキシフェニル乳酸の精製

培地中に生産されたD-4-ヒドロキシフェニル乳酸は、有機溶媒を用いた抽出法と再結晶法を用いて精製された。抽出溶媒は、酢酸エチルとヘキサンの混合溶媒（混合比1:1）を用いた。

[0324] まず、遠心分離して菌体を除去した培養上清に塩酸を加えて酸性化（pH2.5～3.5）し、それに抽出溶媒を等量加え、30分間緩やかに攪拌し、抽出作業を行った。

[0325] その後、有機溶媒層を回収し、培養液に再度新しい抽出溶媒を加え、前述の工程を行った。回収した有機溶媒層をエバポレートにより蒸発乾固し、D-4-ヒドロキシフェニル乳酸を含有する粉末固体を得た。

[0326] 得られた粉末固体から高純度のD-4-ヒドロキシフェニル乳酸を得るために、トルエンを加え、90～100℃で粉末を十分に溶解させ、その後、ゆっくり冷

却させることでトルエン溶液中に白色結晶を得ることができた。

[0327] トルエンを除き、洗浄した白色結晶をキラルカラムとGC/MS（GC-2010 SHIMADZU社製）に供した結果、白色結晶が高純度の光学活性のD-4-ヒドロキシフェニル乳酸（純度約９９％）であることが確認された（図２３参照）。

[0328] ＜実施例５＞酵母W.fluoresensTK1株を利用したD-4-ヒドロキシフェニル乳酸の発酵生産

本菌が、培地に添加したチロシンを4-ヒドロキシフェニル乳酸に変換可能であることを示した。本菌は、グルコースを原料として、シキミ酸経路、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸を経由して4-ヒドロキシフェニル乳酸を生成すると考えられた。生産される4-ヒドロキシフェニル乳酸は光学活性体（D-4-ヒドロキシフェニル乳酸）であった。

[0329] ＜高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いた4-ヒドロキシフェニル乳酸の定量＞

試料中のヒドロキシフェニル乳酸の定量はＨＰＬＣを用いて、以下の分析条件にて、分析する。

[0330] なお、培養液を分析する場合は、濾過や遠心分離等により菌体を除去した培養上清を試料として使用する。

[0331] 分析器：HP-1100 (Hewlett-Packard)

カラム：TSKgel ODS-80(登録商標) (4.6 × 150 mm, Tosoh, Tokyo, Japan)

カラム温度：28℃

流速：0.8 mL/min

移動相：20 mm potassium phosphate buffer (pH 2.5): methanol (6:4, v/v)

＜ガスクロマトグラフィー質量分析計（GC/MS）を用いた4-ヒドロキシフェニル乳酸の定性＞

培養液5 mLを、1% NaOHを用いてpH を9から10に調整し、遠心エバポレーターを用いて減圧乾燥した。得られた沈殿を、1% NaOH 200 μL、Methanol 167

μL、Pyridine 34 μLに完全に懸濁した。これに、Methyl chlorocarbonateを20 μL加え、激しく攪拌することにより試料をメチル化した。Methyl chlorocarbonateを加え攪拌する操作を繰り返した後、Chloroformを400 μL加え、攪拌した。次に、50 mM Sodium bicarbonateを加え、攪拌後の水層を除去した。得られたChloroform層に0.1gのSodium sulfateを加えることによりChloroform層を完全に脱水し、得られた溶液に含まれる有機酸をGC/MS (GCMS-QP2010 Plus、Shimadzu) を用いて測定した。分析の条件を以下に示す。

[0332] 分析器：GC/MS-QP2010 Plus (Shimadzu)

カラム：DB-5 (0.32 mm x 30 m)

カラム温度：60 ℃ (2 min)-8℃/min-180℃ (5 min)-40℃/min-220℃ (5 min)

インターフェイス温度：230℃

イオンソース温度：250℃

キャリアガス：He

流量：30 ml/min

＜生産した4-ヒドロキシフェニル乳酸の光学異性＞

〔HPLCを用いたキラル分析〕

培養液中の4-ヒドロキシフェニル乳酸の光学異性を、HPLCを用いて、以下の分析条件にて、決定する。なお、培養液から濾過や遠心分離等により菌体を除去した培養上清を試料として使用する。

[0333] 分析器：HP-1100 (Hewlett-Packard)

カラム：Nucleosil Chiral-1 (Macherey-Nagel)

カラム温度：60℃

流速：1.2 mL/min

移動相：0.5 mM $CuSO_4$

＜生産した4-ヒドロキシフェニル乳酸の光学異性＞

培養上清を回収し適宜メタノールで希釈したものを分析試料とする。ヒドロキシフェニル乳酸濃度の測定は、HPLCを用いて、以下の分析条件にて決定

する。

[0334] 分析器：HP-1100 (Hewlett-Packard)

カラム：ODS-column (5C18-MS-II : COSMSIL)

カラム温度：28℃

流速： 0.8 mL/ min

移動相：20ｍM　リン酸：メタノール＝4：6

以上、本発明の酵素PPRを利用すると、チロシンをＤ－４－ヒドロキシフェニル乳酸に変換可能である。更に、シキミ酸経路及びヒドロキシフェニルピルビン酸を経由するような形質転換体を利用することで、グルコースを原料としてＤ－４－ヒドロキシフェニル乳酸を生成することが可能である。

[0335] そして、本発明の酵素PPR及びこれをコードする遺伝子を利用すれば、Ｄ－４－ヒドロキシフェニル乳酸を、選択的に作製することも可能である。

[0336] よって、Ｄ－フェニル乳酸及びＤ－４－ヒドロキシフェニル乳酸の発酵生産を行い、生産物であるＤ－フェニル乳酸及びＤ－４－ヒドロキシフェニル乳酸を高純度に得られる技術が確立された。また、その生産量も既報に比べて格段に多く、次項の産業用途にとって有益である。

産業上の利用可能性

[0337] 独自に発見した新規なＤ－３－フェニル乳酸生産菌から、高純度の光学活性３－フェニル乳酸及び４－ヒドロキシフェニル乳酸を効率よく得ることが可能となる本発明のＰＰＲ及びこれコードするpprA遺伝子を得た。pprA遺伝子を導入した形質転換体によって、安価なグルコースを原料として高純度の光学活性３－フェニル乳酸及び４－ヒドロキシフェニル乳酸を効率よく得、遺伝子工学的製造も可能である。

[0338] この光学活性３－フェニル乳酸は、広範囲の分野にて注目されており、例えば、ポリアロマ系プラスチック原料、生体適合性材料、機能性材料、医薬農業中間体としての利用が期待されている。同様に、光学活性４－ヒドロキシフェニル乳酸も、食品添加物、医薬、農薬等としての利用が期待されている。更には、従来困難といわれている芳香族系化合物の発酵生産技術構築の

ためのブレイクスルーとなる可能性を有している。

請求の範囲

[請求項1] フェニルピルビン酸を基質としてＤ－フェニル乳酸を生成するフェニルピルビン酸還元酵素をコードするポリヌクレオチドであって、

（ａ）配列番号５に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド、

（ｂ）配列番号５に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、

（ｃ）配列番号５に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドと６０％以上の同一性を有する塩基配列からなるポリヌクレオチド、

（ｄ）配列番号６，７又は８に示される塩基配列を含むポリヌクレオチド、

（ｅ）配列番号４に示されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、

（ｆ）配列番号４に示されるアミノ酸配列において、１若しく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をコードするポリヌクレオチド、及び

（ｇ）配列番号４に示されるアミノ酸配列と６０％以上の同一性を有するアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、

からなる群より選択されるポリヌクレオチド。

[請求項2] フェニルピルビン酸を基質としてＤ－フェニル乳酸を生成するフェニルピルビン酸還元酵素であって、

（ａ）配列番号４に示されるアミノ酸配列、

（ｂ）配列番号４に示されるアミノ酸配列において、１若しく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、又は

（ｃ）配列番号４に示されるアミノ酸配列と６０％以上の同一性を有するアミノ酸配列、

のいずれかを含む、フェニルピルビン酸還元酵素。

[請求項3] 請求項１に記載のヌクレオチドを含有する組換えベクター。

[請求項4] 請求項３に記載の組換えベクターを含む形質転換体。

［請求項5］ 宿主が微生物である請求項４に記載の形質転換体。

［請求項6］ 前記微生物が大腸菌又はフェニルアラニン若しくはチロシン生産性組換微生物である請求項５に記載に形質転換体。

［請求項7］ 次の（ａ）、（ｂ）又は（ｃ）のタンパク質からなるフェニルピルビン酸還元酵素を用いて、フェニルピルビン酸又は４－ヒドロキシフェニルピルビン酸を基質としてＤ－フェニル乳酸又はＤ－４－ヒドロキシフェニル乳酸を生成させ、これを回収することを特徴とするＤ－フェニル乳酸又はＤ－４－ヒドロキシフェニル乳酸の製造方法：

（ａ）配列番号４に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、

（ｂ）配列番号４に示されるアミノ酸配列において、１若しく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るタンパク質、又は

（ｃ）配列番号４に示されるアミノ酸配列と６０％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質。

［請求項8］ 前記フェニルピルビン酸還元酵素の反応条件が、反応温度２０～４０℃、ｐＨ６～７であることを特徴とする請求項７に記載のＤ－フェニル乳酸又はＤ－４－ヒドロキシフェニル乳酸の製造方法。

［請求項9］ 次の（ａ）、（ｂ）又は（ｃ）のタンパク質からなるフェニルピルビン酸還元酵素をコードする遺伝子を含む微生物を用いて培養し、微生物基質からＤ－フェニル乳酸又はＤ－４－ヒドロキシフェニル乳酸を生成させ、これを回収することを特徴とするＤ－フェニル乳酸又はＤ－４－ヒドロキシフェニル乳酸の製造方法：

（ａ）配列番号４に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、

（ｂ）配列番号４に示されるアミノ酸配列において、１若しく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るタンパク質、又は

（ｃ）配列番号４に示されるアミノ酸配列と６０％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質。

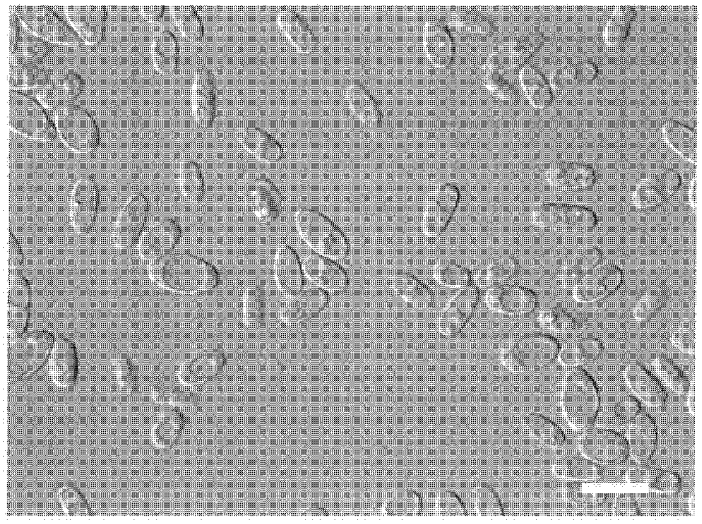
[請求項10] 前記微生物が、ウィッケルハミア属酵母若しくはこれを親株とした変異株又は請求項４又は５に記載の形質転換体であることを特徴とする請求項９に記載のＤ－フェニル乳酸又はＤ－４－ヒドロキシフェニル乳酸の製造方法。

[請求項11] 前記微生物基質がＤ－グルコース、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－チロシン、フェニルピルビン酸及び４－ヒドロキシフェニルピルビン酸から選ばれる１種以上の基質であることを特徴とする請求項９に記載のＤ－フェニル乳酸又はＤ－４－ヒドロキシフェニル乳酸の製造方法。

[請求項12] ウィッケルハミア属酵母が、Wicherhamia fluorescensである請求項１０に記載のＤ－フェニル乳酸又はＤ－４－ヒドロキシフェニル乳酸の製造方法。

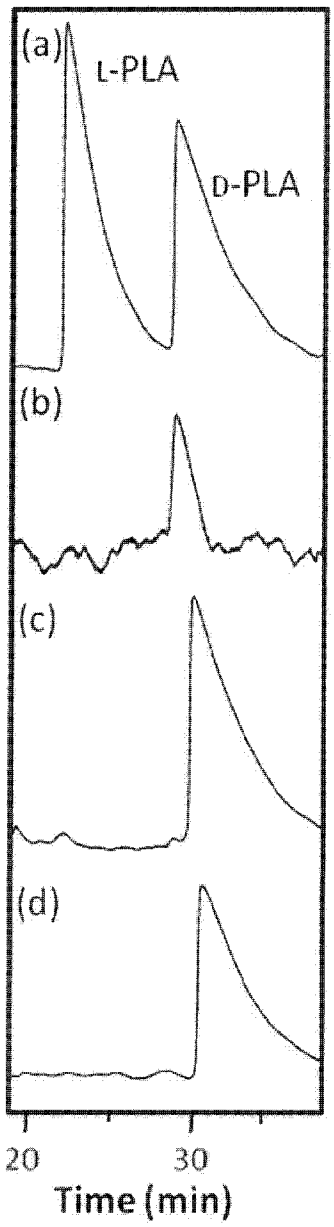
[請求項13] ウィッケルハミア　フルオレセンス（Wicherhamia fluorescens）TK1と命名され、FERM AP-22048として寄託された微生物。

[図1]



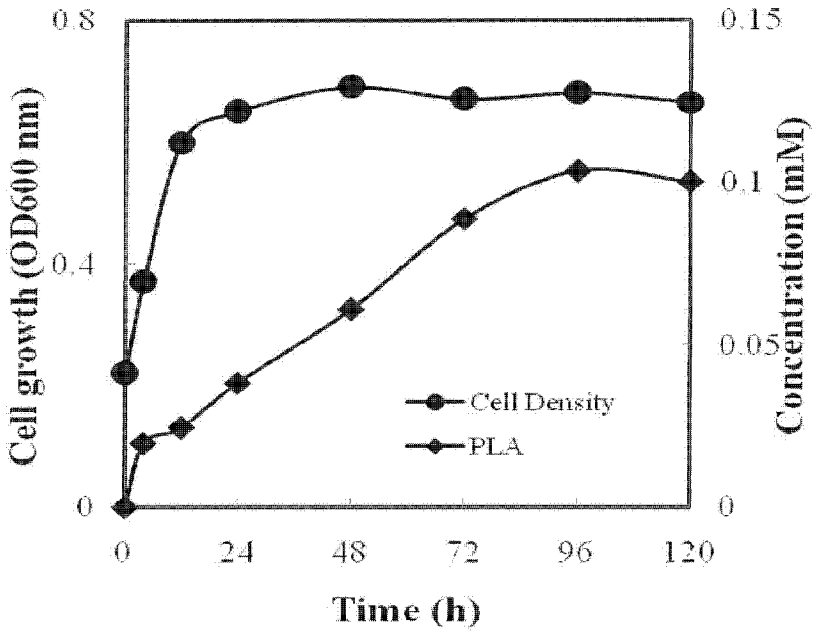
. Vegetative cells of Strain TK1

[図2]

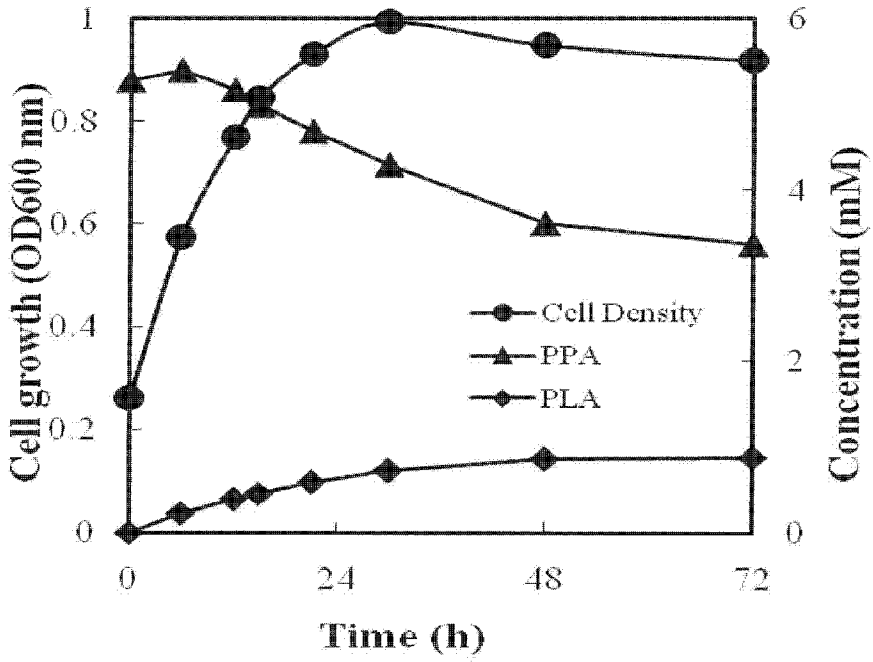


HPLC profiles of L-phenyllactate and D-phenyllactate.
(a) L-Phenyllactate was eluted as the first peak at 22.4 min while D-Phenyll actate was eluted at 31.7 min. (b) The supernatant of MM medium after cu lturing *W. fluorescens* TK1. (c) The supernatant of GPMM medium after cu lturing *W. fluorescens* TK1. (d) The reaction mixture after the PPR reaction.

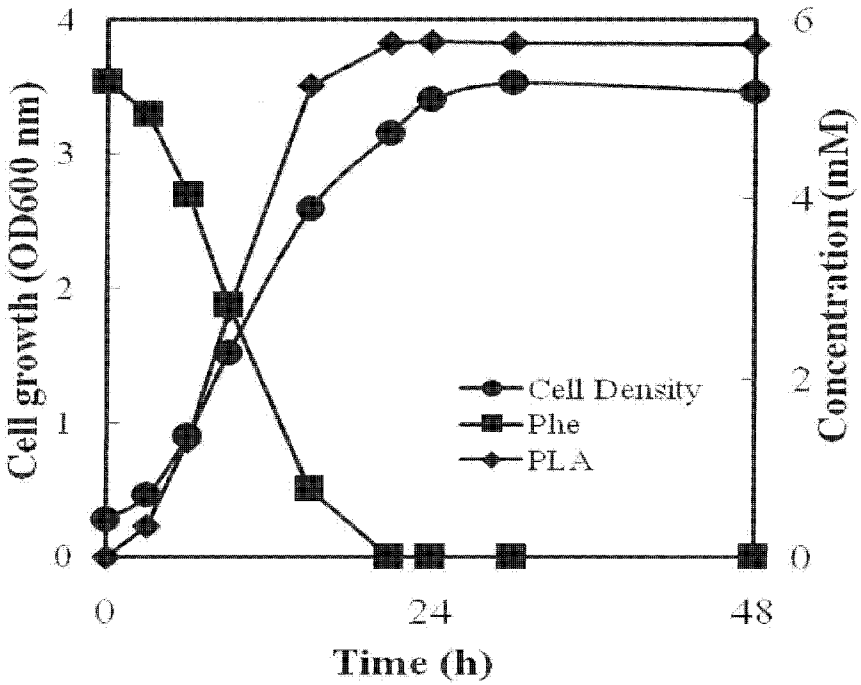
[図3]


0.8
0.4
0
0.15
0.1
0.05
0
Cell growth (OD600 nm)
Concentration (mM)
Cell Density
PLA
0
24
48
72
96
120
Time (h)

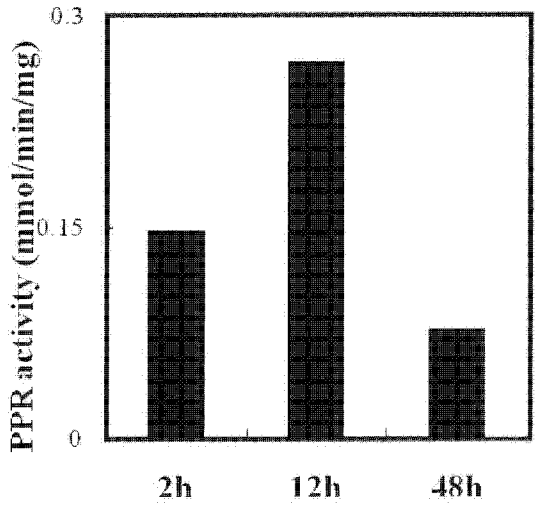
[図4]


1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
6
4
2
0
Cell growth (OD600 nm)
Concentration (mM)
Cell Density
PPA
PLA
0
24
48
72
Time (h)

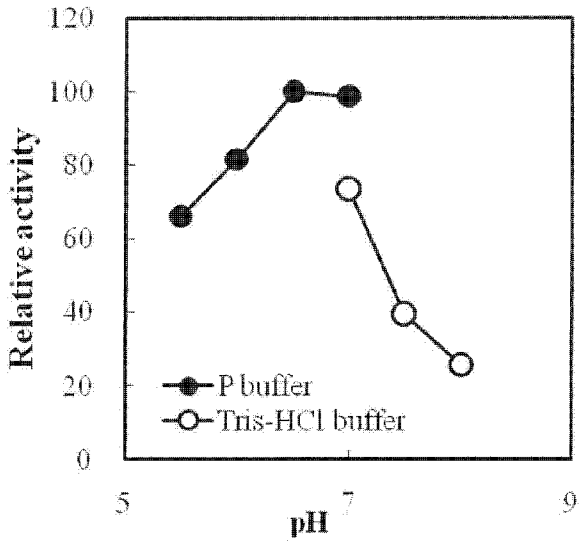
[図5]


Cell growth (OD600 nm)
Concentration (mM)
Cell Density
Phe
PLA
Time (h)
0
24
48
0
1
2
3
4
0
2
4
6

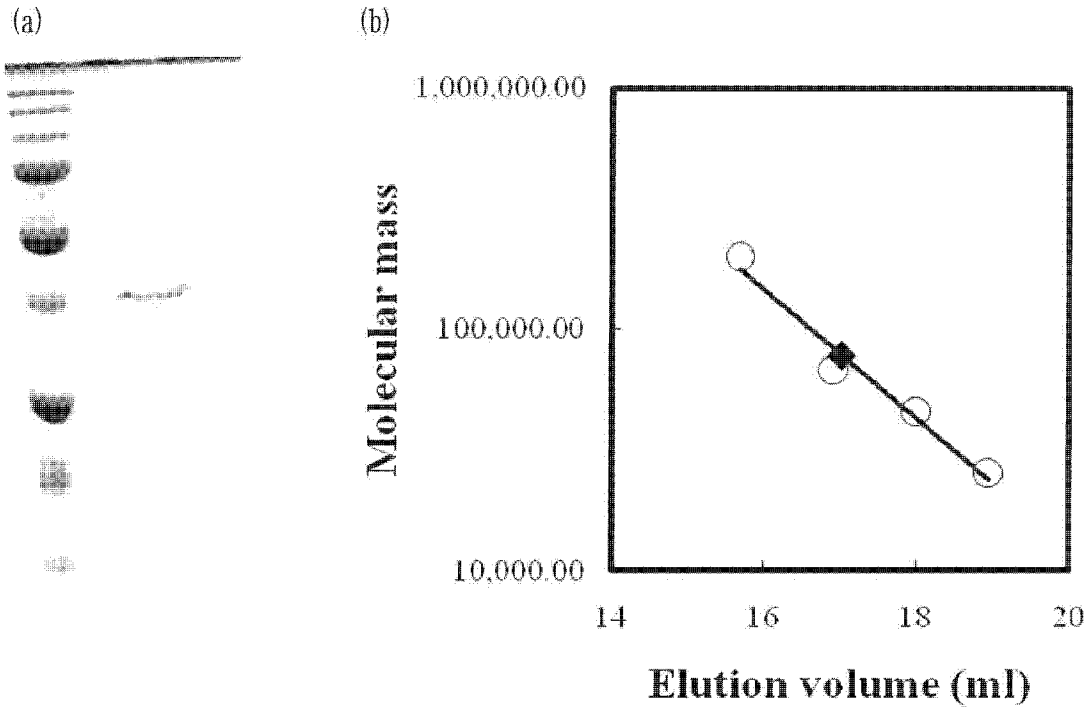
[図6]


PPR activity (mmol/min/mg)
0.3
0.15
0
2h
12h
48h

[図7]



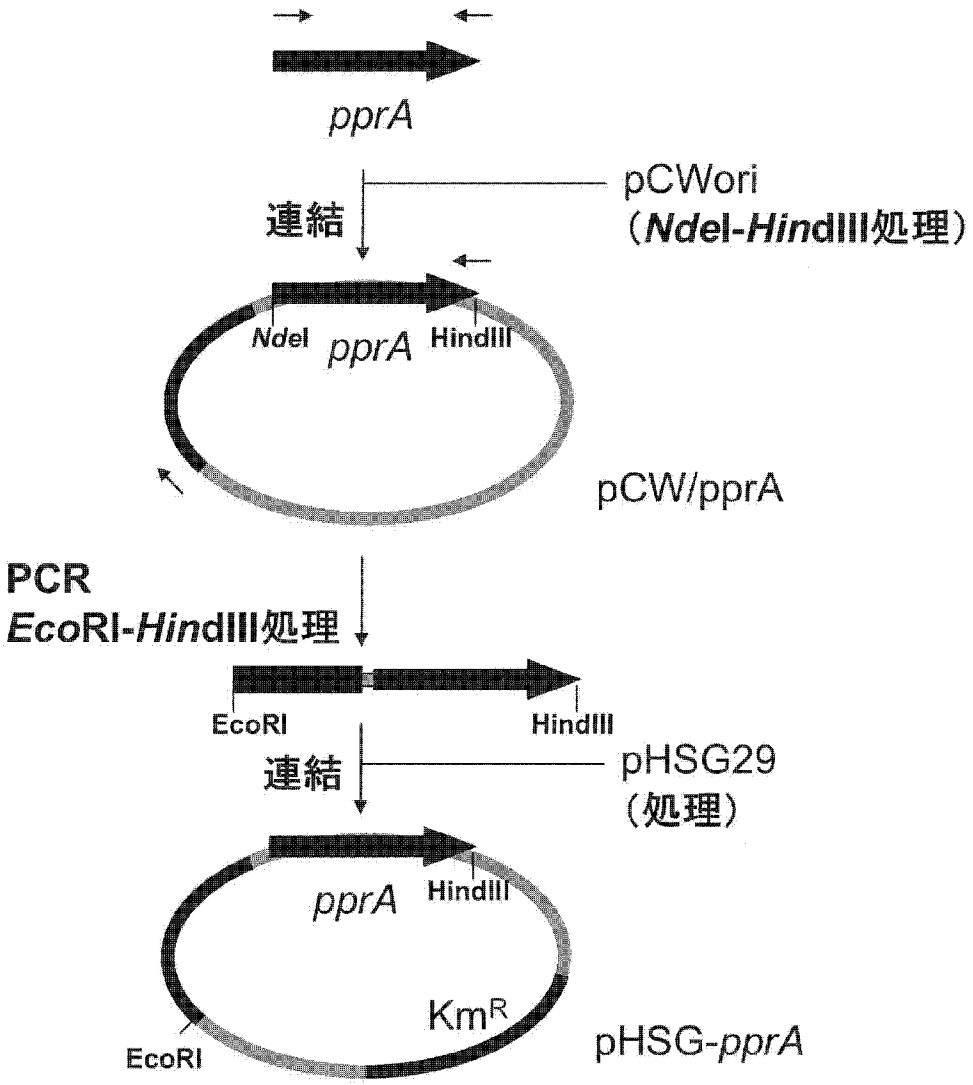
[図8]



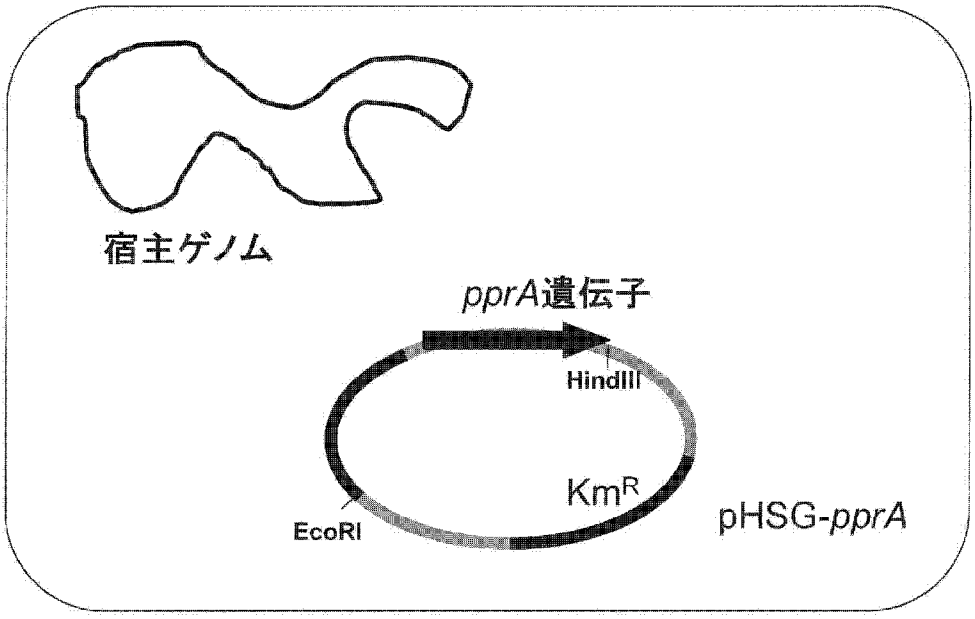
The molecular mass of PPR.

(a) SDS-PAGE analysis of PPR ;(b) Molecular weight of PPR by gel filtration chromatography

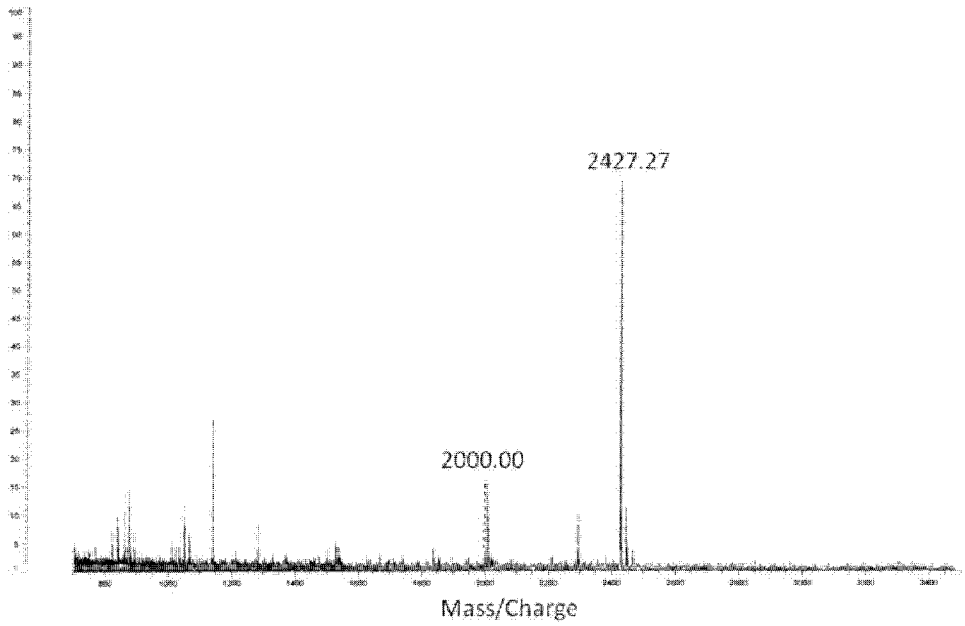
[図9]


pprA
連結
pCWori
(NdeI-HindIII処理)
NdeI
pprA
HindIII
pCW/pprA
PCR
EcoRI-HindIII処理
EcoRI
HindIII
連結
pHSG29
(処理)
pprA
HindIII
KmR
EcoRI
pHSG-pprA

[図10]



[図11]

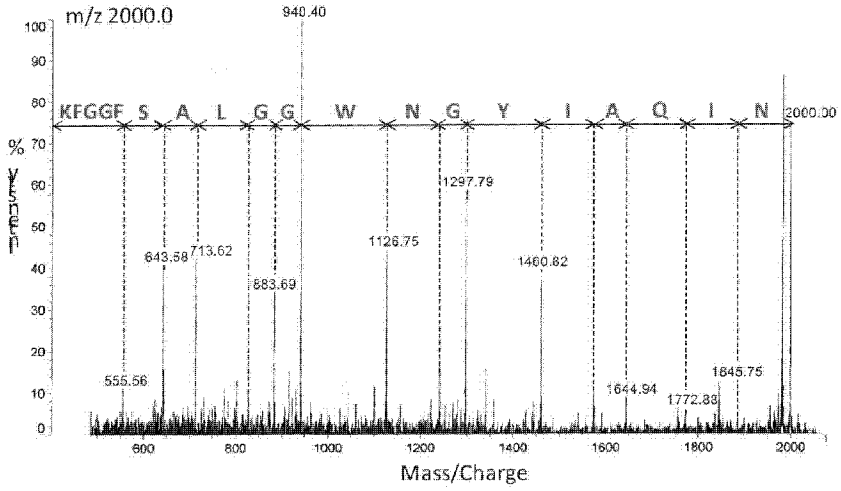


MS spectra of MALDI-TOF and MS^2 spectra of MALDI-QIT-TOF for one of tryptic peptides from PPR

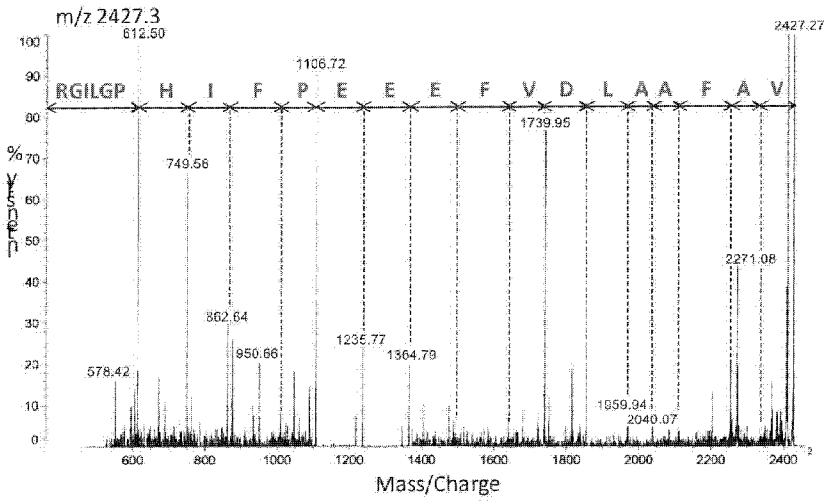
Positive ion MALDI-TOF mass spectra of PPR from *W. fluorescens* NRRLYB-4819.

[図12]

(a)



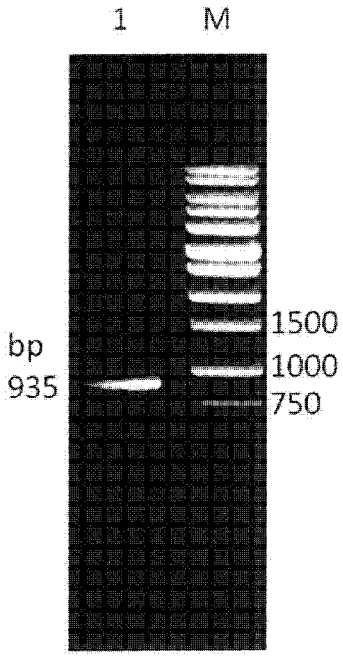
(b)



MS spectra of MALDI-TOF and MS^2 spectra of MALDI-QIT-TOF for one of t ryptic peptides from PPR.

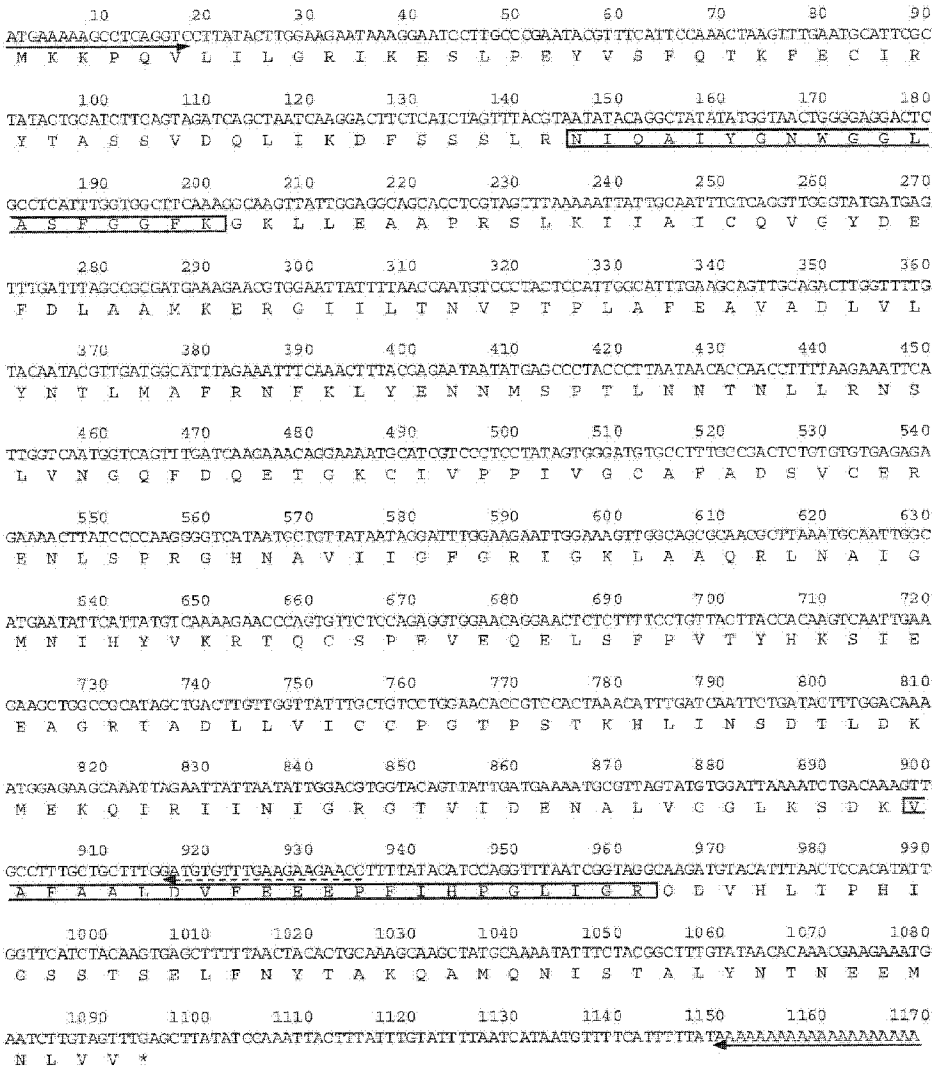
(a) (b) MS/MS spectra of mass ion peaks at *m/z* 2000.0 (b)and 2427.3 (c) shown in panel

[図13]



Agarose gel electrophoresis of the nested PCR products
1: PCR product for *pprA*. M: DNA markers

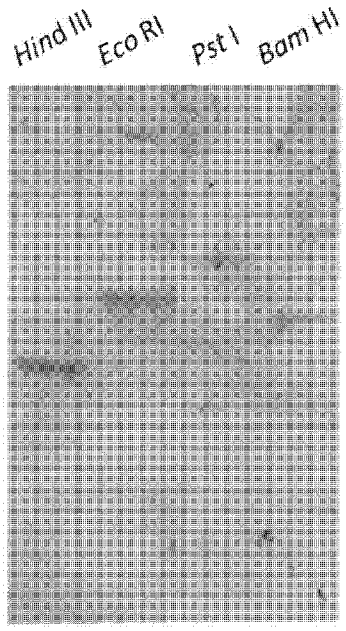
[図14]



Nucleotide sequence of the *W. fluorescens* TK1 PPR gene and its deduced amino a cid sequence.

Internal amino acid sequences of P P R determined by MAIDI-QIT-TOF MS ana lysis are boxed. Positions of Ppimers NP and Oligo dT are shown by arrows. The nest ed primer 2427P is indicated with a broken arrows. The stop codon is indicated by an asterisk.

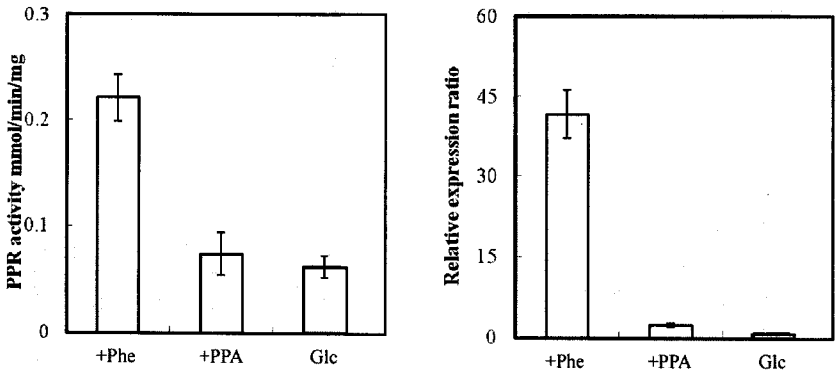
[図15]



Southern blot analysis of total DNA using *pprA* as a probe.

Total DNA isolated from *W. fluorescens* TK1 was digested with the restriction enzyme *Hin*d III, *Eco* RI, *Pst* I, and *Bam* HI, electrophoresed, blotted onto Zeta-Probe® Blotting Membrane (Bio-Rad), and subjected to hybridization using the probe.

[図16]



Effect of phenylalanine on PPR activity and gene expression.

(A) Specific activities of PPR in cell-free extracts of *W. fluorescens* TK1 grown at 30°C for 10 h. The cells were cultured in MM medium containing 56 mM glucose (Glc), 56 mM glucose plus 5 mM phenylalanine (+Phe), and 56 mM glucose plus 5 mM phenylpyruvate (+PPA). (B) Quantitive PCR analysis of *pprA* transcript. *W. fluorescens* NRRLYB-4819 was cultured as described above. *Bars* represent relative expression rates deteremined by real-time PCR.

[図17]



SDS-PAGE of purified rPPR.
Recombinant PPR. Lane *1*, purified rPPR; *M*, molecular mass standard (Bio-Rad Precision Protein Standard kit). Molecular masses are shown on the left.

[図18]

```
WfPPR -MKKPQVLILGRIKESLPEYVSFQTKFECIRYTASSVDQLIKDFSSSLRNIQAIYGNWGGLASFGGFKGKLLEAAPRSLK    79
CdHDH MTIKQKVLFLE--KPNVEDLKQFEAKFDCIYYTLSTLEQLLIDFQTSLQDVEAIYCGWNGFGMFGGFRGKVLAHAPQSLR    78
EcGXR --MKPSVILYK----ALPDDLLQRLQEHFTVHQVANLSPQTVEQNAAIFAEAEGLLGSN-----ENVNAALLEKMPK-LR    68
SsHPPR -MEAIGVLMMC----PMSTYLEQELDKRFKLFRYWTQPAQRDFLALQAESIRAVVGNSN-----AGADAELIDALPK-LE    69
LpDLDH ----MKIIAYA-----VRDDERPFFDTWMKENPDVEVKLVPELLTEDNVDLAKGFDGADVYQQKDYTAEVLNKLADEGVK    71

WfPPR IIAICQVGYDEFDLAAMKERGIILTNVPTPLAFEAVADLVLYNTLMAFRNFKLYENNMSPTLN-NTNLLRNSLVNGQFDQ   158
CdHDH IVATCSVGYDGFDIERMSERNIVLTNVPSPLAFEAVADLALYNAINSFRNFKLYAENLSSNQYGHSGVSRTSMLHGNFDQ   158
EcGXR ATSTISVGYDNFDVDALTARKILLMHTPT-VLTETVADTLMALVLSTARRVVEVAERVK--------------AGEWTA   132
SsHPPR IVSSFSVGLDKVDLIKCEEKGVRVTNTPD-VLTDDVADLAIGLILAVLRRICECDKYVR--------------RGAWK-   132
LpDLDH NISLRNVGVDNLDVPTVKARGLNISNVPA-YSPNAIAELSVTQLMQLLRQTPLFNKKLA----------------KQDF   133

WfPPR ETGKCIVPPIVGCAPADSVCERENLSPRGHNAVIIGFGRIGKLAAQRLNA-IGMNIHYVKRTQCSPEVEQELSFPVTYHK   237
CdHDH SSGKAIVEPVVGHTYGYACCKRDNLSPRGHNAVIVGFGHIGELIGRRLAC-IGMNVHYVKRTRLSESQEKSLGYEVTYHE   237
EcGXR SIGPDWYG---------------TDVHHKTLGIVGMGRIGMALAQRAHFGFNMPILYNARRHHKEAEERFN----ARYC   192
SsHPPR -FGDFKLT---------------TKFSGKRVGIIGLGRIGLAVAERAEA-FDCPISYFSRSKKPNTNYTY-------YG   187
LpDLDH RWAPDIAK---------------ELNTMTVGVIGTGRIGRAAIDIFKG-FGAKVIGYDVYRNAELEKEG-----MYVD   190

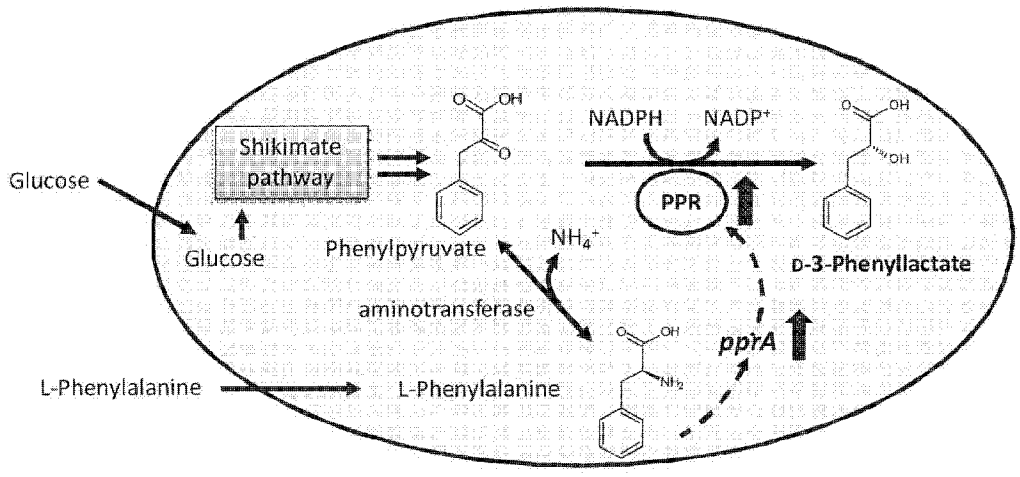
WfPPR SIEEAGRIADLLVICCPGTPSTKHLINSDTLDKMEKQIRIINIGRGTVIDENALVCGLKSDKVAFAALDVFEEEPPF----   313
CdHDH SLEETKDIADLIIIACPGTPSTRHMINKQLINSMGKPFRIINIGRGFVIDEDALVGGLKSGKVLFAGLDVFENEPT----   313
EcGXR DLDTLLQESDFVCLILPLTDETHHLFGAEQFAKMKSSAIFINAGRGPVVDENALIAALQKGEIHAAGLDVFEQEPLS---   269
SsHPPR SVVELASNSDILVVACPLTPETTHIINREVIDALGPKGVLINIGRGPHVDEPELVSALVEGRLGGAGLDVFEREPE----   263
LpDLDH TLDELYAQADVITLHVPALKDNYHMLNADAFSKMKDGAYILNFARGTLIDSEDLIKALDSGKVAGAALDTYEYETKIFNK   270

WfPPR ----------IHPGLIGRQDVHLTPHIGSSTSELFNYTAKQAMQNISTALYNTNEEMNLVV----   364
CdHDH ----------IHPGLLGRDDVVLTPHIGSGIAENYRFTALTSMRNIETILRGYDEEINRVN----   364
EcGXR ----------VDSPLLSMANVVAVPHIGSATHETRYGMAACAVDNLIDALQGKVEKNCVNPHVAD   324
SsHPPR ----------VPEKLFGLENVVLLPHVGSGTVETRKVMADLVVGNLEAHFSGKPLLTPVV-----   313
LpDLDH DLEGQTIDDKVFMNLFNRDNVLITPHTAFYTETAVHNMVHVSMNSNKQFIETGKADTQVKFD---   332
```

Multiple alignments of deduced amino acid sequences of PPR form *W. fluorescens* TK1 and other organisms.

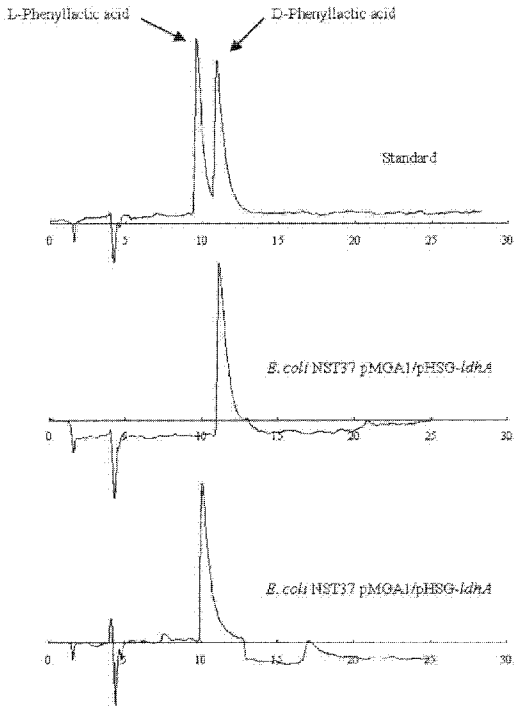
Protein primary structures are aligned using the CLUSTALX. Sequences are PPR-related proteins of *C. dubliniensis* (accession no. XP_002418129), *E. coli* (P37666), *S. scutellarioide* (Q65CJ7), and *L. plantarum* (BAA14352). Asterisks indicate identical amino acids. Dots and colons indicate conserved amino acids with substitutions. Dashes indicate computer-generated gaps. An open box indicates the conserved sequence for the NAD-binding motif

[図19]

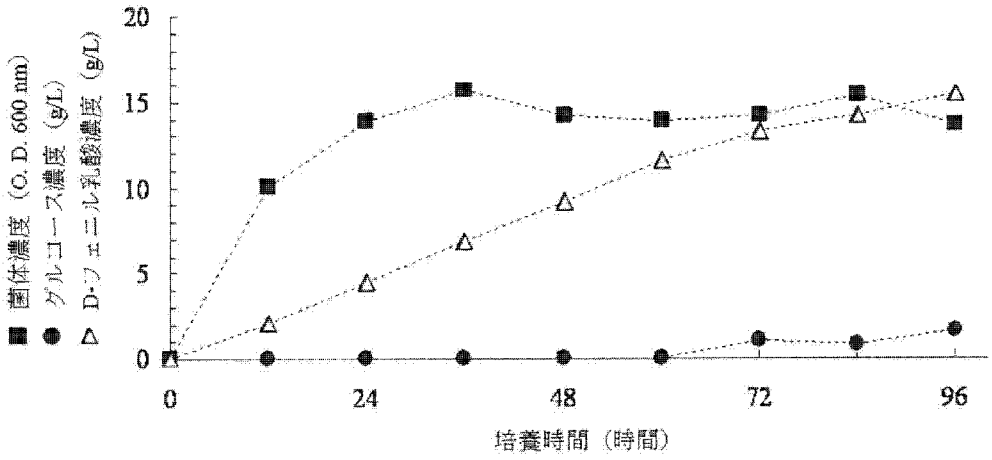


D-3-Phenyllactate biosynthesis pathway in *W. fluorescens* TK1.

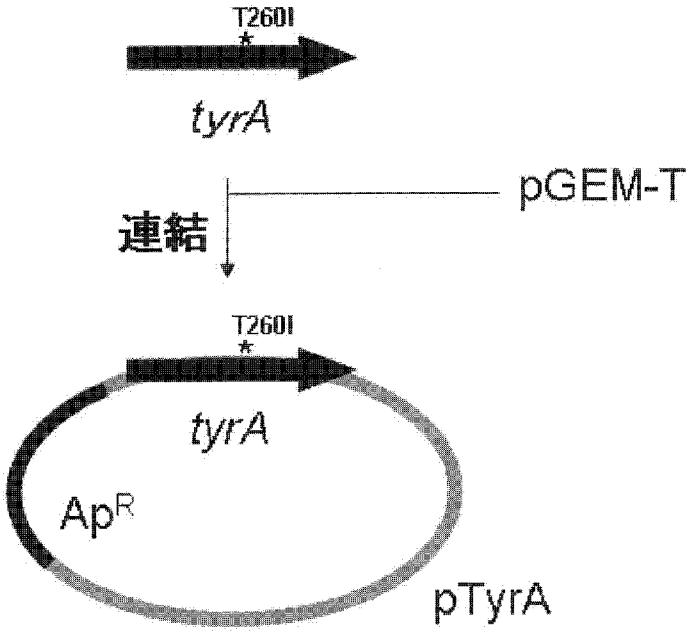
[図20]


L-Phenyllactic acid
D-Phenyllactic acid
Standard
E. coli NST37 pMGA1/pHSG-ldhA
E. coli NST37 pMGA1/pHSG-ldhA

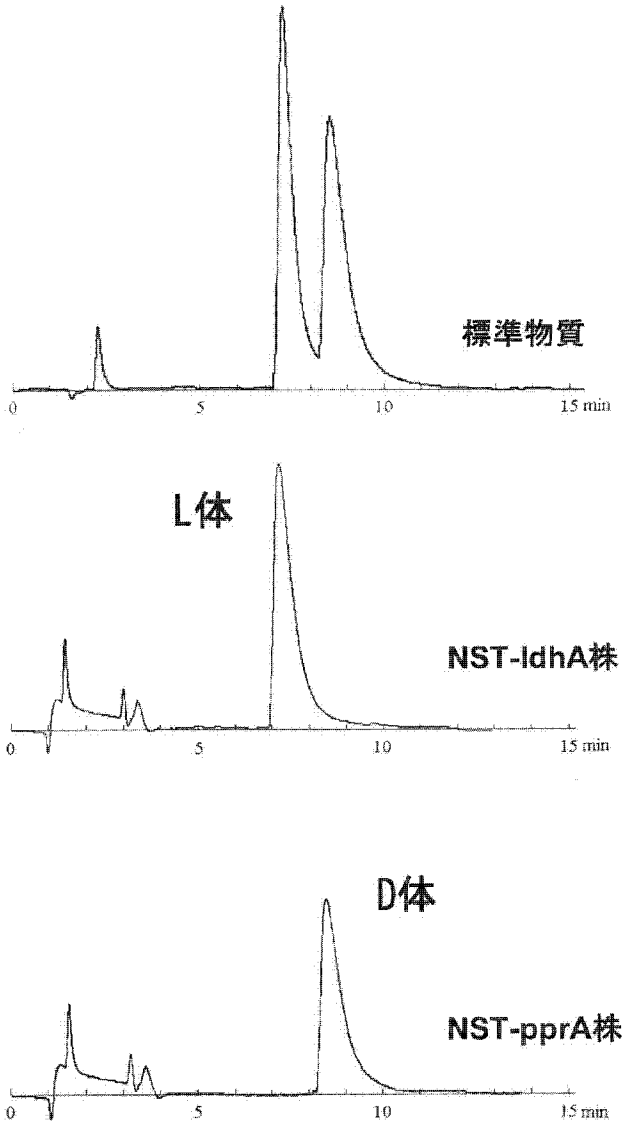
[図21]


菌体濃度（O. D. 600 nm）
グルコース濃度（g/L）
D-フェニル乳酸濃度（g/L）
20
15
10
5
0
0
24
48
72
96
培養時間（時間）

[図22]



[図23]


標準物質
0
5
10
15 min
L体
NST-ldhA株
0
5
10
15 min
D体
NST-pprA株
0
5
10
15 min

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2012/051989

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/09(2006.01)i, *C12N1/15*(2006.01)i, *C12N1/19*(2006.01)i, *C12N1/21*(2006.01)i, *C12N5/10*(2006.01)i, *C12P7/56*(2006.01)i, *C12N9/02*(2006.01)n

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)
C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12P7/56, C12N9/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2012 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2012

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), UniProt/GeneSeq, PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BODE, R., et al., "Purification and Properties of D-Aromatic Lactate Dehydrogenase: An Enzyme Involved in the Catabolism of the Aromatic Amino Acids of Candida maltosa", Biochem. Physiol. Pflanzen, 1986, 181, 189-98	1-13
A	RINTALA, E., et al., "The ORF YNL274c (GOR1) codes for glyoxylate reductase in Saccharomyces cerevisiae", Yeast, 2007.02, 24(2), 129-36	1-13
A	HYMAN, B.C., et al., "Resolution of mitochondrial DNA structures in the large yeast Wickerhamia fluorescens", Exp. Cell Res., 1982, 141(1), 221-30	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family 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 application or patent 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 April, 2012 (10.04.12)	24 April, 2012 (24.04.12)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2012/051989

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	FUJII, T., et al., "Novel fungal phenylpyruvate reductase belongs to d-isomer-specific 2-hydroxyacid dehydrogenase family", Biochim. Biophys. Acta, 2011.12, 1814(12), 1669-76, Epub. 2011 Jun. 13	1-13
P,X	Takashi ITO et al., "Development of D-phenyllactic acid-producing Escherichia coli using molecular breeding", Dai 63 Kai Abstracts of the Annual Meeting of the Society for Biotechnology, Japan, 25 August 2011 (25.08. 2011), 152, 2Fa15	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2012/051989

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

It is considered that the special technical feature of the inventions described in claims 1-12 in the meaning within PCT Rule 13.2, second sentence, resides in a protein having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 4 in the present application and a nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 5 in the present application. On the other hand, the special technical feature of the invention described in claim 13 resides in a microorganism named Wickerhamia fluorescens TK1 and deposited under Accession Number FERM AP-22048, and does not have the same or corresponding special technical feature in the relationship with respect to the special technical feature of the

(continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

inventions described in claims 1-12.

Thus, there is found no technical relationship in the meaning within PCT Rule 13 between the inventions described in claims 1-12 and the invention described in claim 13.

Consequently, claims 1-13 do not comply with the requirement of unity of invention.

Claims include two inventions, i.e., an invention described in claims 1-12 and an invention described in claim 13.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１２／０５１９８９

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/09(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12P7/56(2006.01)i, C12N9/02(2006.01)n

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12P7/56, C12N9/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１２年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１２年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１２年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), UniProt/GeneSeq, PubMed

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	BODE, R., et al., "Purification and Properties of D-Aromatic Lactate Dehydrogenase: An Enzyme Involved in the Catabolism of the Aromatic Amino Acids of Candida maltosa", Biochem. Physiol. Pflanzen, 1986, 181, 189-98	1-13
A	RINTALA, E., et al., "The ORF YNL274c (GOR1) codes for glyoxylate reductase in Saccharomyces cerevisiae", Yeast, 2007.02, 24(2), 129-36	1-13

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 １０．０４．２０１２	国際調査報告の発送日 ２４．０４．２０１２
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　４５０３ 神谷　昌男 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	HYMAN, B.C., et al., "Resolution of mitochondrial DNA structures in the large yeast Wickerhamia fluorescens", Exp. Cell Res., 1982, 141(1), 221-30	1-13
PX	FUJII, T., et al., "Novel fungal phenylpyruvate reductase belongs to d-isomer-specific 2-hydroxyacid dehydrogenase family", Biochim. Biophys. Acta, 2011.12, 1814(12), 1669-76, Epub. 2011 Jun. 13	1-13
PX	伊藤尚志　他, "糖代謝改変によるD-フェニル乳酸高生産菌の分子育種", 第６３回日本生物工学会大会講演要旨集, 2011.08.25, 152, 2Fa15	1-13

第Ⅰ欄　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

１．この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、提出された以下の配列表に基づき国際調査を行った。

ａ．提出手段
- ☐ 紙形式
- ☑ 電子形式

ｂ．提出時期
- ☑ 出願時の国際出願に含まれていたもの
- ☐ この国際出願と共に電子形式により提出されたもの
- ☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出されたもの

２．☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しを提出した場合、出願後に提出した配列の写し若しくは追加して提出した配列の写しが、出願時に提出した配列と同一である旨又は出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

３．補足意見：

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１２／０５１９８９

第Ⅱ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第8条第3項（ＰＣＴ17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

１．☐ 請求項＿＿＿＿＿＿＿＿は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、

２．☐ 請求項＿＿＿＿＿＿＿＿は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

３．☐ 請求項＿＿＿＿＿＿＿＿は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求項１－１２に係る発明のＰＣＴ規則１３．２の第２文の意味における特別な技術的特徴は、本願配列番号４のアミノ酸配列及び本願配列番号５の塩基配列タンパク質にあると認められる。一方、請求項１３に係る発明の特別な技術的特徴は、ウィッケルハミア・フルオレセンスＴＫ１と命名され、ＦＥＲＭ　ＡＰ－２２０４８として寄託された微生物であり、請求項１－１２に係る発明の特別な技術的特徴との関係において、同一の又は対応する特別な技術的特徴を有していない。

よって、請求項１－１２に係る発明と請求項１３に係る発明の間には、ＰＣＴ規則１３の意味おける技術的な関連を見いだすことができない。

したがって、請求項１－１３は、単一性を満たしていない。

請求の範囲には、請求項１－１２に記載の発明と請求項１３に記載の発明の２つの発明が記載されている。

１．☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。

２．☑ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

３．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

４．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。