

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-534790

(P2023-534790A)

(43)公表日 令和5年8月14日(2023.8.14)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)		
C 1 2 N	15/53 (2006.01)	C 1 2 N	15/53		4 B 0 6 4	
C 1 2 N	9/06 (2006.01)	C 1 2 N	9/06	Z Z N A	4 B 0 6 5	
C 1 2 N	15/70 (2006.01)	C 1 2 N	15/70	Z		
C 1 2 N	15/77 (2006.01)	C 1 2 N	15/77	Z		
C 1 2 N	15/78 (2006.01)	C 1 2 N	15/78	Z		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全30頁)	最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-500346(P2023-500346)	(71)出願人	519414848			
(86)(22)出願日	令和3年7月14日(2021.7.14)		エボニック オペレーションズ ゲーエム			
(85)翻訳文提出日	令和5年3月2日(2023.3.2)		ベーハー			
(86)国際出願番号	PCT/EP2021/069597		Evonik Operations G			
(87)国際公開番号	WO2022/013287		mbH			
(87)国際公開日	令和4年1月20日(2022.1.20)		ドイツ連邦共和国 4 5 1 2 8 エッセン			
(31)優先権主張番号	20185930.3		レリングハウザー シュトラッセ 1-11			
(32)優先日	令和2年7月15日(2020.7.15)		Rellinghauser Stra			
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		sse 1-11, 4 5 1 2 8 Ess			
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(74)代理人	110002538			
		弁理士法人あしたば国際特許事務所				
		(72)発明者	ステファン シャファー			
			ドイツ連邦共和国 4 5 6 9 9 ヘルテン			
			アントニウスシュトラッセ 1 9			
			最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 オキシドレダクターゼをコードするアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド

(57)【要約】

本発明は、ファインケミカルの生産のための発酵プロセスの分野にあり、アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、およびオキシドレダクターゼを使用する発酵プロセスを包含する。

【選択図】 図 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 (ジオバチルス属種 (*Geobacillus* sp.) PA9)、配列番号 3 (サーマス・サーモフィルス (*Thermus thermophilus*))、配列番号 4 (ストレプトミセス・グロビスポラス (*Streptomyces globisporus*))、配列番号 5 (クロストリジウム・アミノブチリカム (*Clostridium aminobutyricum*))、配列番号 6 (バークホルデリア・セパシア (*Burkholderia cepacia*))、配列番号 8 (オスキラトリア属種 (*Oscillatoria* sp.) PCC 6506)、配列番号 9 (パラバークホルデリア・フィマツム (*Paraburkholderia phymatum*)) のアミノ酸配列と少なくとも $\geq 50\%$ 同一であり、

10

配列番号 1 の 202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214 位の 1 つ以上、または配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 9 のアミノ酸配列の対応する位置におけるアミノ酸交換を特徴とし、

前記アミノ酸交換が、A210S または S212A ではない、

オキシドレダクターゼをコードするアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 2】

配列番号 1 (ジオバチルス属種 PA9)、配列番号 3 (サーマス・サーモフィルス)、配列番号 4 (ストレプトミセス・グロビスポラス)、配列番号 5 (クロストリジウム・アミノブチリカム)、配列番号 6 (バークホルデリア・セパシア)、配列番号 7 (カプリアビダス・ネカトル (*Cupriavidus necator*))、配列番号 8 (オスキラトリア属種 PCC 6506)、配列番号 9 (パラバークホルデリア・フィマツム) のアミノ酸配列と少なくとも $\geq 65\%$ 同一であり、

20

配列番号 1 の 202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214 位の 1 つ以上、または配列番号 3、配列番号 4、配列 ID: 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9 のアミノ酸配列の対応する位置におけるアミノ酸交換を特徴とする、

請求項 1 に記載のオキシドレダクターゼをコードするアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド。

30

【請求項 3】

配列番号 1 (ジオバチルス属種 PA9)、配列番号 3 (サーマス・サーモフィルス)、配列番号 4 (ストレプトミセス・グロビスポラス)、配列番号 5 (クロストリジウム・アミノブチリカム)、配列番号 6 (バークホルデリア・セパシア)、配列番号 7 (カプリアビダス・ネカトル)、配列番号 8 (オスキラトリア属種 PCC 6506)、配列番号 9 (パラバークホルデリア・フィマツム)、配列番号 10 (ラルストニア・ピッケティ (*Ralstonia pickettii*)) のアミノ酸配列と少なくとも $\geq 90\%$ 同一であり、

配列番号 1 の 202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214 位の 1 つ以上、または配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10 のアミノ酸配列の対応する位置におけるアミノ酸交換を特徴とする、

40

請求項 1 または 2 に記載のオキシドレダクターゼをコードするアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 4】

・202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214 位の 1 つ以上にアミノ酸交換を有する配列番号 1 (ジオバチルス属種 PA9)；

・194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205 位の 1 つ以上にアミノ酸交換を有する配列番号 3 (サーマス・サーモ

50

フィルス) ; または配列番号 21 ;

・ 212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222 位の 1 つ以上にアミノ酸交換を有する配列番号 4 (ストレプトミセス・グロビスポラス) ; または配列番号 22 ;

・ 202、203、204、205、206、207、208、209、210 位の 1 つ以上にアミノ酸交換を有する配列番号 5 (クロストリジウム・アミノブチリカム) ; または配列番号 23 ;

・ 202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212 位の 1 つ以上にアミノ酸交換を有する配列 ID : 6 (バークホルデリア・セパシア) ; または配列番号 24 ;

・ 203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213 位の 1 つ以上にアミノ酸交換を有する配列番号 7 (カプリアピダス・ネカトル) ; または配列番号 25 ;

・ 209、210、211、212、213、214、215、216、217 位の 1 つ以上にアミノ酸交換を有する配列番号 8 (オスキラトリア属種 PCC 6506) ; または配列番号 26 ;

・ 192、193、194、195、196、197、198、199、200、201 位の 1 つ以上にアミノ酸交換を有する配列番号 9 (パラバークホルデリア・フィマツム) ; または配列番号 27 ;

・ 203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217 位の 1 つ以上にアミノ酸交換を有する配列番号 10 (ラルストニア・ピッケティ) ; または配列番号 28

から選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のオキシドレダクターゼをコードするアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 5】

配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13 または配列番号 14 のアミノ酸配列と少なくとも $\geq 92\%$ 、 $\geq 94\%$ 、 $\geq 96\%$ 、 $\geq 97\%$ 、 $\geq 98\%$ 、 $\geq 99\%$ または 100% 、好ましくは $\geq 97\%$ 、特に好ましくは $\geq 98\%$ 、非常に特に好ましくは $\geq 99\%$ 、極めて好ましくは 100% 同一である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のオキシドレダクターゼをコードするアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドであって、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13 および配列番号 14 が、207 位または前記アミノ酸配列の対応する位置に L-バリン以外のタンパク質構成アミノ酸を有する、ポリヌクレオチド。

【請求項 6】

ジオバチルス属の微生物由来の酵素 4-ヒドロキシフェニル酢酸 3-モノオキシゲナーゼをコードする複製可能なヌクレオチド配列であり、それによってコードされるタンパク質配列が、配列番号 1 の 207 位に対応する位置に L-バリン以外のタンパク質構成アミノ酸を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のオキシドレダクターゼをコードするアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のオキシドレダクターゼをコードするアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドであって、それによってコードされるアミノ酸配列が、207 位または対応する位置に、トレオニン、ロイシン、グルタミンおよびグリシンからなる群より選択されるアミノ酸を有する、ポリヌクレオチド。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のオキシドレダクターゼをコードするアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドであって、それによってコードされるアミノ酸配列が、-206 位もしくは前記アミノ酸配列の対応する位置に、L-トレオニン以外のタンパク質構成アミノ酸、好ましくは L-メチオニンもしくは L-アラニンを含むか ; または -208 位もしくは前記アミノ酸配列の対応する位置に、L-リジン以外のタンパク質構成アミノ酸、好ましくは L-アルギニンを含む、

10

20

30

40

50

ポリヌクレオチド。

【請求項 9】

配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 29、配列番号 30、配列番号 31、配列番号 32 のアミノ酸配列と少なくとも $\geq 90\%$ 、 $\geq 92\%$ 、 $\geq 94\%$ 、 $\geq 96\%$ 、 $\geq 97\%$ 、 $\geq 98\%$ 、 $\geq 99\%$ または 100% 、好ましくは $\geq 97\%$ 、特に好ましくは $\geq 98\%$ 、非常に特に好ましくは $\geq 99\%$ 、極めて好ましくは 100% 同一である、請求項 1～8 のいずれか一項に記載のオキシドレダクターゼをコードするアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 10】

請求項 1～9 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

10

【請求項 11】

エシェリキア属、シュドモナス属またはコリネバクテリウム属の微生物における複製に適する、請求項 10 に記載のベクター。

【請求項 12】

請求項 1～9 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を含む、ポリペプチド。

【請求項 13】

請求項 1～9 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、または請求項 10 に記載のポリペプチド、または請求項 10 もしくは 11 に記載のベクターを含む、エシェリキア属、シュドモナス属またはコリネバクテリウム属の微生物。

20

【請求項 14】

請求項 1～7 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドが過剰発現された形態で存在する、請求項 13 に記載の微生物。

【請求項 15】

ファインケミカルを産生する能力を有し、好ましくは前記ファインケミカルが L-ジヒドロキシフェニルアラニン (L-DOPA) であることを特徴とする、請求項 13 または 14 に記載の微生物。

【請求項 16】

ファインケミカルを生産するための発酵プロセスであって、以下の工程：

a) 培地中での、配列番号 1 または配列番号 3～配列番号 32 のアミノ酸配列と少なくとも $\geq 90\%$ 、 $\geq 92\%$ 、 $\geq 94\%$ 、 $\geq 96\%$ 、 $\geq 97\%$ 、 $\geq 98\%$ 、 $\geq 99\%$ または 100% 、好ましくは $\geq 97\%$ 、特に好ましくは $\geq 98\%$ 、非常に特に好ましくは $\geq 99\%$ 、極めて好ましくは 100% 同一である、オキシドレダクターゼをコードするアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを含む微生物の発酵、

30

b) 発酵プロセスが得られる、前記培地中の前記ファインケミカルの蓄積を含む、発酵プロセス。

【請求項 17】

前記ファインケミカルまたは液体もしくは固体のファインケミカル含有生成物が、前記ファインケミカル含有発酵プロセスから得られ、前記ファインケミカルが L-DOPA であることを特徴とする、請求項 16 に記載のプロセス。

40

【請求項 18】

L-DOPA の発酵生産のための、請求項 13～15 のいずれか一項に記載の微生物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ファインケミカルの生産のための発酵の分野にあり、オキシドレダクターゼをコードするアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドおよびオキシドレダクターゼを使用する発酵プロセスを包含する。

【背景技術】

50

【0002】

パーキンソン病に罹患している患者は、振せん、硬直または運動緩徐のような症状を経験し、これらは、大脳基底核における細胞死に起因する低レベルのドーパミンによって引き起こされる。ドーパミンは血液脳関門を通過することができないので、その前駆体分子であるL-DOPA（L-ジヒドロキシフェニルアラニン）が、患者の症状を軽減するための薬剤として使用される。1977年に最初に発売されて以来、L-DOPA（レボドパ）は、600MTの世界的市場規模で、最も有望なパーキンソン治療へと進化した。

【0003】

既存の生産プロセスは、化学合成、特に不斉水素化または水素化とキラル分割に基づく。これは確立された製造プロセスであるが、変換率および全体的な効率が低い。あるいは、L-DOPAは、酵素の変換、すなわちピルビン酸とカテコールとの酵素的カップリングによって生成される。しかしながら、この酵素変換プロセスには、原料コストが高いという難点がある。

10

【0004】

大腸菌（*Escherichia coli*）（*E. coli*）由来の4-ヒドロキシフェニル酢酸3-モノオキシゲナーゼHpaBおよび同族の4-ヒドロキシフェニル酢酸3-モノオキシゲナーゼレダクターゼHpaCを使用した発酵プロセスが文献に記載されており、変換率およびエナンチオ選択性がより高く、より経済的なプロセスであるため、有利であり得る。

20

【0005】

経済的に魅力的なプロセスを達成するためには、一方でチロシン生産性を最適化し、他方でHpaB活性の増加によるL-チロシンのL-DOPAへの変換を最適化することが重要である。

【0006】

4-ヒドロキシフェニル酢酸-モノオキシゲナーゼ酵素の広い基質スペクトルはPrieto et al., 1993に記載されており、非天然基質のL-チロシンを用いた酵素活性は、天然基質の4-HPA（4-ヒドロキシフェニル酢酸）を用いた酵素活性のわずか5%であることが示された。したがって、酵素活性を高めるための有望な選択肢として酵素モデリングが考えられた。

【0007】

Shen et al., Scientific Reports (2019) 9:7087 / <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43577-w>, p. 1-11は、大腸菌由来のフラビン依存性ヒドロキシラーゼ（HpaB）の触媒汎用性に関する構造的洞察を記載している。Shen et al. は、大腸菌由来の4-ヒドロキシフェニル酢酸3-ヒドロキシラーゼ（EcHpaB）が広範囲のフェノール化合物の効率的なオルトヒドロキシル化の能力を有し、広範な化学酵素用途の大きな可能性を示すことに言及している。その触媒汎用性の構造的および機能的基礎を理解するために、Shen et al. は、X線結晶構造解析によってEcHpaBの結晶構造を解明し、活性部位を覆う独特のループ構造を明らかにした。Shen et al. はさらに、基質特異性および触媒活性におけるその役割を調べるために、このループの突然変異誘発試験を実施した。その結果は、ループが大きな可塑性および広範な突然変異誘発に対する強い耐性を有することを示しただけでなく、活性部位への基質の進入および安定な結合を可能にする柔軟なループが酵素の触媒汎用性にとって重要な因子であり得ることも示唆した。様々なEcHpaB変異体のループ配列および構造が報告されている。しかしながら、L-DOPAに対する選択性の増強は記載されていない。

30

40

【0008】

Fordjour et al., Microbial Cell Factories (2019) 18:74 / <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1122-0>, p. 1-10は、D-グルコースからのL-DOPAのデノボ生産のための大腸菌BL21（DE3）の代謝操作を記載する。galPおよびgl

50

k の過剰発現を通して炭素流を誘導しながら、*tyrR*、*ptsG*、*crr*、*pheA* および *pykF* を欠失させることによって大腸菌 BL21 (DE3) を操作した。E4P および PEP の蓄積を増強するために、*TktA* および *ppsA* も過剰発現させた。部位指定突然変異誘発を *HpaB* に適用して、その活性を最適化した。3 つの変異体、G883R、G883A および L1231M は、野生型 *hpaB* と比較して改善された活性を有すると同定され、それぞれ L-DOPA 産生の 3.03 倍、2.9 倍および 2.56 倍の増加を示した。LP-8 株の使用により、振とうフラスコおよび 5 L バイオリアクタにおいてそれぞれ 691.24 mg/L および 25.53 g/L の L-DOPA の産生がもたらされた。

【0009】

欧州特許出願公開第 3150712A1 号 (Symrise) は、3,4-ジヒドロキシフェニル化合物およびそのメチル化変異体を提供するための生物工学的方法を記載する。欧州特許出願公開第 3150712A1 号は、それにより、4-ヒドロキシフェニル化合物をヒドロキシル化して 3,4-ジヒドロキシフェニル化合物を生成するためのプロトタイプ酵素 4-ヒドロキシフェニル酢酸 3-ヒドロキシラーゼ (4HPA3H) の活性部位結合ポケットの合理的設計によって得られる遺伝子改変された酵素、ならびに前記酵素またはその触媒活性断片を使用するインビボおよびインビトロ方法を含む生物工学的方法に関する。

【0010】

中国特許出願公開第 107541483A 号 (Tianjin) は、レボドパの組換え産生のための大腸菌株、その構築方法および用途を記載する。中国特許出願公開第 107541483A 号は、それにより、大腸菌組換え株 T002 を用いて L-DOPA を産生するための方法を提供しており、この方法では、L-DOPA を産生することができる 3-脱水素酵素、シキミ酸デヒドロゲナーゼの発現を増強するために *aroE* 遺伝子の上方制御が実施される。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【特許文献 1】 欧州特許出願公開第 3150712A1 号明細書

【特許文献 2】 中国特許出願公開第 107541483A 号明細書

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献 1】 Prieto et al., 1993

【非特許文献 2】 Shen et al., Scientific Reports (2019) 9:7087 / <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43577-w>, p. 1-11

【非特許文献 3】 Fordjour et al., Microbial Cell Factories (2019) 18:74 / <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1122-0>, p. 1-10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

最適化されたチロシン産生および L-チロシンの L-DOPA への高い変換率を有する、L-DOPA の生産のための経済的に魅力的な発酵プロセスを提供することが本発明の目的であった。細胞内および／または媒質中での生成物の改善された収率またはより高い最終濃度を有する L-DOPA の生産プロセスが必要とされている。このプロセスは、L-DOPA の効率的な生産を確実にするために拡張可能である必要がある。

本発明のさらなる目的は、L-DOPA を大量に産生することができるように改変された細胞を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明の発明人は、驚くべきことに、オキシドレダクターゼ HpaB の突然変異が L-DOPA の産生の増加および L-チロシンの L-DOPA へのより高い変換率をもたらすことを確認した。

【0015】

本発明は、配列番号 1 (ジオバチルス属種 (*Geobacillus* sp.) PA9)、配列番号 3 (サーマス・サーモフィルス (*Thermus thermophilus*))、配列番号 4 (ストレプトミセス・グロビスポラス (*Streptomyces globisporus*))、配列番号 5 (クロストリジウム・アミノブチリカム (*Clostridium aminobutyricum*))、配列 ID: 6 (バークホルデリア・セパシア (*Burkholderia cepacia*))、配列番号 8 (オスキラトリア属種 (*Oscillatoria* sp.) PCC 6506)、配列番号 9 (パラバークホルデリア・フィマツム (*Paraburkholderia phymatum*)) のアミノ酸配列と少なくとも $\geq 50\%$ 同一であり、

【0016】

配列番号 1 の 202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214 位の 1 つ以上、または配列番号 3、配列番号 4、配列 ID: 5、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 9 のアミノ酸配列の対応する位置におけるアミノ酸交換を特徴とし、アミノ酸交換が A210S または S212A ではない、

オキシドレダクターゼをコードするアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドに関する。

【0017】

本発明によれば、配列番号 1 の 210 位または配列番号 3、配列番号 4、配列 ID: 5、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 9 のアミノ酸配列の対応する位置におけるアラニンからセリンへのアミノ交換、および配列番号 1 の 212 位または配列番号 3、配列番号 4、配列 ID: 5、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 9 のアミノ酸配列の対応する位置におけるセリンからアラニンへのアミノ交換は除外され、本発明の一部ではない。

【0018】

代替形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 1 の 202、203、204、205、206、207、208、209、211、213、214 位の 1 つ以上、または配列番号 3、配列番号 4、配列 ID: 5、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 9 のアミノ酸配列の対応する位置にアミノ酸交換を有する。

好ましい実施形態では、オキシドレダクターゼは、配列番号 2 の 4-ヒドロキシフェニル酢酸 3-モノオキシゲナーゼではない。

好ましい実施形態では、アミノ酸交換は、L-DOPA の産生の増加および / または L-チロシンの L-DOPA へのより高い変換率をもたらす。

好ましい実施形態では、ヌクレオチド配列によってコードされるオキシドレダクターゼは、4-ヒドロキシフェニル酢酸 3-モノオキシゲナーゼである。

【0019】

本発明によれば、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 4、配列 ID: 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9 および配列番号 10 によってコードされる酵素は、4-ヒドロキシフェニル酢酸 3-モノオキシゲナーゼである。

【0020】

ジオバチルス属種 PA-9 由来のホモログを合理的酵素設計の出発点として選択し、一連の突然変異を標準化された全細胞スクリーニングシステムで試験した。スクリーニングシステムで得られた有望な結果を 1 L 発酵スケールに移すことにより、これらの結果が確認され、大腸菌およびジオバチルス属種 PA-9 野生型遺伝子を発現する参照株と比較して、変異酵素の性能の有意な増加が示された。

【0021】

「配列番号 1 の対応する位置」または「アミノ酸配列の 202、203、204、20

10

20

30

40

50

5、206、207、208、209、210、211、213、214位に相当する位置」という表現は、コードされたポリペプチドのN末端領域（配列番号1の202～214位に基づく）のアミノ酸をコードするコドンの挿入または欠失によって、挿入の場合は位置の記述および長さの記述が形式的に1単位増加しているか、または欠失の場合は1単位減少しているという事実を意味すると解釈される。同様に、コードされたポリペプチドのC末端領域（202～214位に基づく）のアミノ酸をコードするコドンの挿入または欠失によって、長さの記述が、挿入の場合は形式的に1単位増加しているか、または欠失の場合は1単位減少している。そのような相当する位置は、例えばClustal W Programme (Thompson et al., Nucleic Acids Research 22, 4637-4680 (1994)) またはMAFFT Programme (Kato et al., Genome Information 2005; 16 (1), 22-33) を使用して、「アラインメント」の形態でのアミノ酸配列の比較によって容易に同定され得る。「配列番号1の対応する位置」という表現は、異なる種からの異なる配列番号（配列番号3～配列番号10など）に言及する場合、比較する結晶構造内の相同な位置を指す。そのような相同な位置はまた、上記のような「アラインメント」の形態でのアミノ酸配列の比較によって、または構造予測に基づいて同定され得る。

10

【0022】

この場合、配列番号1の位置202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214は、様々な配列における以下の位置に対応する：

20

配列番号3の194位、195位、196位、197位、198位、199位、200位、201位、202位、203位、204位、205位；

配列番号4の212位、213位、214位、215位、216位、217位、218位、219位、220位、221位、222位；

配列番号5の202位、203位、204位、205位、206位、207位、208位、209位、210位；

配列番号6の202位、203位、204位、205位、206位、207位、208位、209位、210位、211位、212位；

配列番号7の203位、204位、205位、206位、207位、208位、209位、210位、211位、212位、213位；

30

配列番号8の209位、210位、211位、212位、213位、214位、215位、216位、217位；

配列番号9の192位、193位、194位、195位、196位、197位、198位、199位、200位、201位；

配列番号10の203位、204位、205位、206位、207位、208位、209位、210位、211位、212位、213位、214位、215位、216位、217位。

【0023】

本発明のオキシドレダクターゼに関して、ホモログHpaB酵素配列をClustal Omegaと整列させ、第2の工程で、HpaB配列の二次構造を予測し、二次構造予測を使用して配列を再整列させた。

40

【0024】

そのような挿入および欠失は、酵素活性に実質的に影響を及ぼさない。「実質的に影響を及ぼさない」とは、前記変異体の酵素活性が、配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチドの活性と最大10%、最大7.5%、最大5%、最大2.5%、または最大1%異なることを意味する。

【0025】

好ましくは、配列番号1（ジオパチルス属種PA9）、配列番号3（サーマス・サーモフィルス）、配列番号4（ストレプトミセス・グロビスポラス）、配列番号5（クロスト

50

リジウム・アミノブチリカム)、配列ID: 6 (バークホルデリア・セパシア)、配列番号7 (カプリアビダス・ネカトル (*Cupriavidus necator*))、配列番号8 (オスキラトリア属種 PCC 6506)、配列番号9 (パラバークホルデリア・フィマツム) のアミノ酸配列と少なくとも $\geq 65\%$ 同一であり、配列番号1の202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214位の1つ以上、または配列番号3、配列番号4、配列ID: 5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9のアミノ酸配列の対応する位置におけるアミノ酸交換を特徴とするアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドは、オキシドレダクターゼをコードする。

【0026】

より好ましくは、配列番号1 (ジオバチルス属種 PA9)、配列番号3 (サーマス・サーモフィルス)、配列番号4 (ストレプトミセス・グロビスポラス)、配列番号5 (クロストリジウム・アミノブチリカム)、配列ID: 6 (バークホルデリア・セパシア)、配列番号7 (カプリアビダス・ネカトル)、配列番号8 (オスキラトリア属種 PCC 6506)、配列番号9 (パラバークホルデリア・フィマツム)、配列番号10 (ラルストニア・ピッケティ (*Ralstonia pickettii*)) のアミノ酸配列と少なくとも $\geq 90\%$ 同一であり、

配列番号1の202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214位の1つ以上、または配列番号3、配列番号4、配列ID: 5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10のアミノ酸配列の対応する位置におけるアミノ酸交換を特徴とするアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドは、オキシドレダクターゼをコードする。

・202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214位の1つまたは複数でアミノ酸交換を有する配列番号1 (*Geobacillus* sp. PA9) ;

・194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205位の1つまたは複数でアミノ酸交換を有する配列番号3 (*Thermus thermophilus*) ; または配列番号21;

・212位、213位、214位、215位、216位、217位、218位、219位、220位、221位、222位のうちの1つ以上でアミノ酸交換を有する配列番号4 (ストレプトミセス・グロビスポラス) ; または配列番号22;

・202位、203位、204位、205位、206位、207位、208位、209位、210位の1つ以上でアミノ酸交換を有する配列番号5 (クロストリジウム・アミノブチリカム) ; または配列番号23;

・202位、203位、204位、205位、206位、207位、208位、209位、210位、211位、212位のうちの1つ以上でアミノ酸交換を有する配列番号6 (バークホルデライ・セパシア) ; または配列番号24;

・203位、204位、205位、206位、207位、208位、209位、210位、211位、212位、213位のうちの1つ以上でアミノ酸交換を有する配列番号7 (カプリアビダス・ネケター) ; または配列番号25;

・209位、210位、211位、212位、213位、214位、215位、216位、217位のうちの1つ以上でアミノ酸交換を有する配列番号8 (オシラトリア種 PCC 6506) ; または配列番号26;

・192位、193位、194位、195位、196位、197位、198位、199位、200位、201位のうちの1つ以上でアミノ酸交換を有する配列番号9 (パラバークホルデリア・フィマタム) ; または配列番号27;

・203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216位の1つまたは複数でアミノ酸交換を有する配列番号10 (ラルストニア・ピケッティ)、217または配列番号28。

異なる配列におけるこれらの位置は、本発明による「アミノ酸配列の対応する位置」が

10

20

30

40

50

意味するものである。

【0027】

配列番号11、配列番号12、配列番号13または配列番号14のアミノ酸配列と少なくとも $\geq 90\%$ 、 $\geq 92\%$ 、 $\geq 94\%$ 、 $\geq 96\%$ 、 $\geq 97\%$ 、 $\geq 98\%$ 、 $\geq 99\%$ または 100% 、好ましくは $\geq 97\%$ 、特に好ましくは $\geq 98\%$ 、非常に特に好ましくは $\geq 99\%$ 、極めて好ましくは 100% 同一であるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドは、オキシドレダクターゼをコードし、ここで、配列番号11、配列番号12、配列番号13および配列番号14は、207位またはアミノ酸配列の対応する位置に、L-バリン以外のタンパク質構成アミノ酸を有する。

【0028】

ポリヌクレオチドは、好ましくは、ジオバチルス属の微生物由来の酵素4-ヒドロキシフェニル酢酸3-モノオキシゲナーゼをコードする複製可能なヌクレオチド配列である配列であり、それによってコードされるタンパク質配列は、配列番号1の207位に対応する位置にL-バリン以外のタンパク質構成アミノ酸を含む。

【0029】

本発明の有利な形態では、ポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列は、207位または対応する位置に、トレオニン、ロイシン、グルタミンおよびグリシンからなる群より選択されるアミノ酸を有する。

ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質配列が、

—206位もしくはアミノ酸配列の対応する位置にL-トレオニン以外のタンパク質構成アミノ酸、好ましくはL-メチオニンもしくはL-アラニンを含むか；または

—208位もしくはアミノ酸配列の対応する位置にL-リジン以外のタンパク質構成アミノ酸、好ましくはL-アルギニンを含む

場合が特に好ましい。

【0030】

好ましい形態では、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32のアミノ酸配列と少なくとも $\geq 90\%$ 、 $\geq 92\%$ 、 $\geq 94\%$ 、 $\geq 96\%$ 、 $\geq 97\%$ 、 $\geq 98\%$ 、 $\geq 99\%$ または 100% 、好ましくは $\geq 97\%$ 、特に好ましくは $\geq 98\%$ 、非常に特に好ましくは $\geq 99\%$ 、極めて好ましくは 100% 同一であるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドは、オキシドレダクターゼをコードする。

【0031】

それに対応して、本発明はまた、そのような配列を含み、1つ以上の挿入または欠失を含む配列番号1～20および配列番号29～32のポリペプチド変異体をコードするポリヌクレオチドおよび核酸分子に関する。好ましくは、ポリペプチドは、アミノ酸の最大5個、最大4個、最大3個または最大2個の挿入または欠失を含む。

本発明はさらに、本発明によるヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチドに関する。

【0032】

本発明は、好ましくはさらに、本発明によるポリヌクレオチド、ベクターおよび／またはポリペプチドを含むエシェリキア属 (*Escherichia*)、シュドモナス属 (*Pseudomonas*) またはコリネバクテリウム属 (*Corynebacterium*) の微生物であって、4-ヒドロキシフェニル酢酸モノオキシゲナーゼ酵素をコードするヌクレオチド配列が、好ましくは過剰発現された形態で存在する微生物に関する。

【0033】

好ましくは、ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドは、207位または対応する位置に、トレオニン、ロイシン、グルタミンおよびグリシンからなる群より選択されるアミノ酸を示し得る。

【0034】

それによってコードされるタンパク質配列は、206位またはアミノ酸配列の対応する

10

20

30

40

50

位置に、Ｌートレオニン以外のタンパク質構成アミノ酸、好ましくはＬ-メチオニンを含み得る。

【００３５】

それによってコードされるタンパク質配列は、２０８位またはアミノ酸配列の対応する位置に、Ｌ-リジン以外のタンパク質構成アミノ酸、好ましくはＬ-アルギニンをさらに含み得る。

【００３６】

本発明はさらに、本発明によるポリヌクレオチドを含み、任意でコリネバクテリウム属、シュードモナス属もしくはエシェリキア属の微生物において複製するか、またはそれに適したプラスミドおよびベクターに関する。

【００３７】

本発明はさらに、本発明によるポリヌクレオチド、ベクターおよびポリペプチドを含むコリネバクテリウム属、シュードモナス属またはエシェリキア属の微生物に関する。

【００３８】

本発明はさらに、本発明によるポリヌクレオチドが染色体に組み込まれていることを特徴とする、本発明による微生物に関する。相同組換えは、本発明によるベクターを使用して、染色体上のＤＮＡ断片を、ベクターによって細胞内に輸送される本発明によるポリヌクレオチドと交換することを可能にする。ベクターの環状ＤＮＡ分子と染色体上の標的ＤＮＡとの間の効率的な組換えのために、本発明によるポリヌクレオチドを含む交換されるＤＮＡ領域は、標的部位に相同なヌクレオチド配列を有する末端に提供される；これらは、ベクターの組み込み部位およびＤＮＡの交換部位を決定する。

例えば、本発明によるポリヌクレオチドは、染色体中の天然遺伝子部位で天然 h p a B 遺伝子と交換され得るか、またはさらなる遺伝子部位に組み込まれ得る。

【００３９】

本発明は、特許請求されるポリヌクレオチドのいずれか、または特許請求されるポリペプチドのいずれか、または特許請求されるベクターのいずれかを含む、大腸菌、シュードモナス・プチダ (P. putida) またはコリネバクテリウム・グルタミカム (C. glutamicum) 種の微生物を提供する。

微生物は、ポリヌクレオチドが過剰発現された形態で存在する微生物であり得る。

【００４０】

微生物は、ファインケミカルを産生する能力を有することを特徴とし得る。ファインケミカルは、好ましくはＬ-ジヒドロキシフェニルアラニン (L-DOPA) である。

【００４１】

過剰発現は、一般に、出発株 (親株) または野生型株が出発株である場合は野生型株と比較して、リボ核酸、タンパク質 (ポリペプチド) または酵素の細胞内濃度または活性の増加を意味すると解釈される。出発株 (親株) は、過剰発現をもたらす手段が株を意味すると解釈される。

【００４２】

過剰発現では、組換え過剰発現の方法が好ましい。これらには、インビトロで提供されるＤＮＡ分子を使用して微生物を産生する全ての方法が含まれる。そのようなＤＮＡ分子は、例えば、プロモータ、発現カセット、遺伝子、対立遺伝子、コード領域などを含む。これらは、形質転換、コンジュゲーション、形質導入などの方法によって所望の微生物に変換される。

【００４３】

発現または過剰発現の程度は、遺伝子によって転写された m R N A の量を測定する工程、ポリペプチドの量を決定する工程、および酵素活性を決定する工程によって確立することができる。

ファインケミカルを生産するための発酵プロセスであって、以下の工程：

a) 培地中での、配列番号 1 または配列番号 3 ~ 配列番号 32 のアミノ酸配列と少なくとも $\geq 90\%$ 、 $\geq 92\%$ 、 $\geq 94\%$ 、 $\geq 96\%$ 、 $\geq 97\%$ 、 $\geq 98\%$ 、 $\geq 99\%$ または 1

10

20

30

40

50

00%、好ましくは $\geq 97\%$ 、特に好ましくは $\geq 98\%$ 、非常に特に好ましくは $\geq 99\%$ 、極めて好ましくは100%同一である、オキシドレダクターゼをコードするアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを含む微生物の発酵、

b) 発酵プロセスが得られる、培地中のファインケミカルの蓄積を含むプロセスが開示される。

【0044】

本発明によるそのようなプロセスの使用は、実施例3に示すように、それぞれの出発株と比較して、生成物濃度およびL-DOPA:L-チロシン比の驚くべき増加をもたらす。

【0045】

使用される培養培地または発酵培地は、それぞれの株の要求を適切に満たさなければならない。様々な微生物の培養培地の説明は、ハンドブック「Manual of Methods for General Bacteriology」of the American Society for Bacteriology (Washington D. C., USA, 1981)に含まれている。培養培地および発酵培地または培地という用語は、相互に交換可能である。

【0046】

炭素源として、糖および炭水化物、例えばグルコース、スクロース、ラクトース、フルクトース、マルトース、糖蜜、甜菜糖またはサトウキビ加工からのスクロース含有溶液、デンプン、デンプン加水分解物およびセルロース、油および脂肪、例えば大豆油、ヒマワリ油、落花生油およびココナッツ脂肪など、脂肪酸、例えばパルミチン酸、ステアリン酸およびリノール酸など、アルコール、例えばグリセロール、メタノールおよびエタノールなど、ならびに有機酸、例えば酢酸または乳酸などを使用することができる。

【0047】

窒素源としては、有機窒素化合物、例えばペプトン、酵母エキス、肉エキス、麦芽エキス、コーンステープリカー、大豆粕および尿素など、または無機化合物、例えば硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、炭酸アンモニウムおよび硝酸アンモニウムなどを使用することができる。窒素源は、個別にまたは混合物として使用することができる。

リン源としては、リン酸、リン酸二水素カリウムもしくはリン酸水素二カリウム、または対応するナトリウム含有塩を使用することができる。

【0048】

培養培地はさらに、例えば、成長に必要な、例えばナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムおよび鉄などの金属の塩化物または硫酸塩の形態の塩、例えば硫酸マグネシウムまたは硫酸鉄を含有しなければならない。最後に、上記の物質に加えて、アミノ酸、例えばホモセリンおよびビタミン、例えばチアミン、ビオチンまたはパントテン酸などの必須成長物質を使用することができる。

前記出発材料は、単一バッチの形態で培養物に添加することができ、または培養中に適切な方法で供給することができる。

【0049】

水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニアもしくはアンモニア水などの塩基性化合物、またはリン酸もしくは硫酸などの酸性化合物は、培養物のpH制御のために適切な方法で使用される。pHは、通常6.0~8.5、好ましくは6.5~8に調整される。泡発生を制御するために、例えば脂肪酸のポリグリコールエステルなどの消泡剤を使用することができる。プラスミドの安定性を維持するために、例えば抗生物質などの適切な選択的に作用する物質を培地に添加することができる。発酵は、好ましくは好氣的条件下で行われる。前記好氣的条件を維持するために、酸素または酸素含有ガス混合物、例えば空気が培養物に導入される。過酸化水素が濃縮された液体の使用も同様に可能である。任意で、発酵は、超大気圧、例えば0.03~0.2 MPaの超大気圧で行われる。培養温度は、通常20°C~45°Cであり、好ましくは25°C~40°C、特に好ましくは3

10

20

30

40

50

0 °C ~ 37 °C である。バッチまたはフェドバッチプロセスの場合、培養は、好ましくは、所望の有機化合物を得るための手段に十分な量が形成されるまで継続される。この目標は、通常、10 時間 ~ 160 時間以内に達成される。連続プロセスでは、より長い培養時間が可能である。微生物の活性により、発酵培地中および／または微生物の細胞中でファインケミカルの濃縮（蓄積）が起こる。

【0050】

適切な発酵培地の例は、とりわけ、米国特許第 5, 770, 409 号、米国特許第 5, 990, 350 号、米国特許第 5, 275, 940 号、国際公開第 2007 / 012078 号、米国特許第 5, 827, 698 号、国際公開第 2009 / 043803 号、米国特許第 5, 756, 345 号または米国特許第 7, 138, 266 号に見出し得る；任意で、使用される株の要件に対して適切な改変を行い得る。

10

【0051】

プロセスは、バッチプロセス、フェドバッチプロセス、反復フェドバッチプロセスおよび連続プロセスからなる群より選択されるプロセスであることを特徴とし得る。

【0052】

プロセスは、ファインケミカルまたは液体もしくは固体のファインケミカル含有生成物がファインケミカル含有発酵ブロスから得られることをさらに特徴とし得る。

好ましい形態では、ファインケミカルは L-ジヒドロキシフェニルアラニン（L-DOPA）である。

【0053】

20

濃度（体積あたりに形成された化合物）、収率（消費された炭素源あたりに形成された化合物）、体積生産性（体積および時間あたりに形成された化合物）およびバイオマスの特異的生産性（細胞乾燥質量もしくはバイオ乾燥質量および時間あたりに形成された化合物）または細胞タンパク質および時間あたりに形成された化合物）または他のプロセスパラメータならびにそれらの組合せの群から選択されるパラメータの 1 つ以上に関する本発明によるプロセスまたは発酵プロセスの性能は、本発明によるプロモータ変異体が存在する微生物を用いたプロセスまたは発酵プロセスに基づいて、少なくとも 0.5 %、少なくとも 1 %、少なくとも 1.5 % または少なくとも 2 % 増加する。

発酵の手段により、所望のファインケミカル、好ましくはアミノ酸または有機酸を含む発酵ブロスが得られる。

30

次いで、ファインケミカルを含む液体または固体形態の生成物が提供されるかまたは生産されるかまたは得られる。

【0054】

発酵ブロスは、好ましい実施形態では、微生物が一定時間および一定温度で培養された発酵培地または栄養培地を意味すると解釈される。発酵培地または発酵中に使用される培地は、所望の化合物の産生を確実にし、典型的には成長および／または生存性を確実にする全ての物質または成分を含む。

したがって、発酵が完了すると、得られた発酵ブロスは以下を含む：

- a) 微生物の細胞の増殖から生じる微生物のバイオマス（細胞塊）、
- b) 発酵の過程で形成された所望のファインケミカル、
- c) 発酵の過程で形成される可能性のある有機副生成物、および
- d) 使用される発酵培地の成分、または発酵によって消費されない出発物質の成分、例えばビオチンなどのビタミン、または硫酸マグネシウムなどの塩。

40

有機副生成物は、発酵に使用される微生物によってそれぞれの所望の化合物に加えて生成され、分泌される可能性がある物質を含む。

【0055】

発酵ブロスは、培養容器または発酵容器から取り出され、任意で収集され、ファインケミカルを含む液体または固体形態の生成物を提供するために使用される。「ファインケミカル含有生成物を得る工程」という表現も、そのために使用される。最も単純な場合には、発酵容器から取り出されたファインケミカル含有発酵ブロス自体が、得られた生成

50

物である。

以下の群：

【0056】

a) 水の部分的 ($>0\% \sim <80\%$) 除去から完全な (100%) または実質的に完全な ($\geq 80\%$ 、 $\geq 90\%$ 、 $\geq 95\%$ 、 $\geq 96\%$ 、 $\geq 97\%$ 、 $\geq 98\%$ 、 $\geq 99\%$) 除去、

b) 除去前に不活性化されていてもよい、バイオマスの部分的 ($>0\% \sim <80\%$) 除去から完全な (100%) または実質的に完全な ($\geq 80\%$ 、 $\geq 90\%$ 、 $\geq 95\%$ 、 $\geq 96\%$ 、 $\geq 97\%$ 、 $\geq 98\%$ 、 $\geq 99\%$) 除去、

c) 発酵の過程で形成された有機副生成物の部分的 ($>0\% \sim <80\%$) 除去から完全な (100%) または実質的に完全な ($\geq 80\%$ 、 $\geq 90\%$ 、 $\geq 95\%$ 、 $\geq 96\%$ 、 $\geq 97\%$ 、 $\geq 98\%$ 、 $\geq 99\%$ 、 $\geq 99.3\%$ 、 $\geq 99.7\%$) 除去、および

d) 使用された発酵培地の成分または発酵によって消費されない出発物質の成分の部分的 ($>0\%$) 除去から完全な (100%) または実質的に完全な ($\geq 80\%$ 、 $\geq 90\%$ 、 $\geq 95\%$ 、 $\geq 96\%$ 、 $\geq 97\%$ 、 $\geq 98\%$ 、 $\geq 99\%$ 、 $\geq 99.3\%$ 、 $\geq 99.7\%$) 除去

から選択される測定値の1つ以上によって、所望の有機化合物の濃縮または精製が発酵プロセスから達成される。このようにして、所望の含有量の化合物を有する生成物が単離される。

水 (測定値 a)) の部分的 ($>0\% \sim <80\%$) 除去から完全な (100%) または実質的に完全な ($\geq 80\% \sim <100\%$) 除去は、乾燥とも呼ばれる。

【0057】

プロセスの変形形態では、使用される発酵培地の水、バイオマス、有機副生成物および非消費成分の完全なまたは実質的に完全な除去によって、所望の有機化合物、好ましくはアミノ酸、より好ましくは L-DOPA の純粋な (≥ 80 重量%、 ≥ 90 重量%) または高純度の (≥ 95 重量%、 ≥ 97 重量%、 ≥ 99 重量%) 生成物形態が成功裏に達成される。a)、b)、c) または d) による手段については、多種多様な技術的指示書が従来技術において利用可能である。

【0058】

L-DOPA を生産するプロセスの場合、発酵プロセスの成分を含まない生成物が得られるプロセスが好ましい。これらの生成物は、特に、ヒト医学、医薬品産業、および食品産業において使用されている。

本発明によるプロセスは、L-DOPA の発酵生産に役立つ。

最後に、本発明は、L-DOPA の発酵生産のための本発明による微生物の使用に関する。

【図面の簡単な説明】

【0059】

【図1】図1は、BioLector スクリーニングを用いた単一変異体による L-DOPA および L-チロシンの産生を示す。

【図2】図2は、BioLector スクリーニングを用いた単一および複数の変異体による L-DOPA および L-チロシンの産生を示す (プラスミドはプラスミド安定化エレメントを含有する)。

【図3】図3は、発酵プロセスを用いた大腸菌 HpaB (上) およびジオバチルス属種 HpaB (下) による 48 時間にわたる L-DOPA および L-チロシンの産生を示す。

【図4】図4は、発酵プロセスを用いたジオバチルス属種 HpaB V207T 変異体 (上) およびジオバチルス属種 HpaB V207L 変異体 (下) による 48 時間にわたる L-DOPA および L-チロシンの産生を示す。

【図5】図5は、ジオバチルス属種 HpaB と 2yyj (サーマス・サーモフィルス由来のオキシドレダクターゼ) のアラインメントを示す。

【図6】図6は、ジオバチルス属種 HpaB と 4oo2 (ストレプトミセス・グロビスポラス由来のオキシドレダクターゼ) のアラインメントを示す。

【図 7】図 7 は、ジオバチルス属種 H p a B と 1 u v 8（クロストリジウム・アミノブチリカム由来のオキシドレダクターゼ）のアラインメントを示す。

【図 8】図 8 は、ジオバチルス属種 H p a B と 3 h w c（バークホルデリア・セパシア由来のオキシドレダクターゼ）のアラインメントを示す。

【図 9】図 9 は、ジオバチルス属種 H p a B と 4 g 5 e（カプリアビダス・ネカトール由来のオキシドレダクターゼ）のアラインメントを示す。

【図 10】図 10 は、ジオバチルス属種 H p a B と 4 i r n（オスキラトリア属種 P C C 6 5 0 6 由来のオキシドレダクターゼ）のアラインメントを示す。

【図 11】図 11 は、ジオバチルス属種 H p a B と 5 i d u（パラバークホルデリア・フィマツム由来のオキシドレダクターゼ）のアラインメントを示す。

【図 12】図 12 は、ジオバチルス属種 H p a B と 6 j h m（ラルストニア・ピッケティ由来のオキシドレダクターゼ）のアラインメントを示す。

【発明を実施するための形態】

【0060】

本発明のさらなる好ましい実施形態を以下に要約する：

【0061】

本発明は、配列番号 1（ジオバチルス属種 P A 9）、配列番号 3（サーマス・サーモフィルス）、配列番号 4（ストレプトミセス・グロビスポラス）、配列番号 5（クロストリジウム・アミノブチリカム）、配列番号 6（バークホルデリア・セパシア）、配列番号 8（オスキラトリア属種 P C C 6 5 0 6）、配列番号 9（パラバークホルデリア・フィマツム）のアミノ酸配列と少なくとも $\geq 50\%$ 同一であり、

配列番号 1 の 202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214 位の 1 つ以上、または配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 9 のアミノ酸配列の対応する位置におけるアミノ酸交換を特徴とし、アミノ酸交換が A 210 S または S 212 A ではない、

オキシドレダクターゼをコードするアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを対象とする。

【0062】

好ましい実施形態では、配列番号 1（ジオバチルス属種 P A 9）、配列番号 3（サーマス・サーモフィルス）、配列番号 4（ストレプトミセス・グロビスポラス）、配列番号 5（クロストリジウム・アミノブチリカム）、配列番号 6（バークホルデリア・セパシア）、配列番号 8（オスキラトリア属種 P C C 6 5 0 6）、配列番号 9（パラバークホルデリア・フィマツム）のアミノ酸配列と少なくとも $\geq 50\%$ 同一であり、

配列番号 1 の 202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214 位、または配列番号 3 の 194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205 位、または配列番号 4 の 212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222 位、または配列番号 5 の 202、203、204、205、206、207、208、209、210 位、または配列番号 6 の 202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212 位、または配列番号 8 の 209、210、211、212、213、214、215、216、217 位、または配列番号 9 の 192、193、194、195、196、197、198、199、200、201 位、の 1 つ以上のアミノ酸交換を特徴とし、アミノ酸交換が A 210 S または S 212 A ではない、

オキシドレダクターゼをコードするアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを対象とする。

さらなる好ましい実施形態では、配列番号 1 の 210 位および 212 位におけるアミノ酸交換は除外される。

【0063】

好ましい実施形態では、配列番号 1（ジオバチルス属種 P A 9）、配列番号 3（サーマ

10

20

30

40

50

ス・サーモフィルス)、配列番号4(ストレプトミセス・グロビスポラス)、配列番号5(クロストリジウム・アミノブチリカム)、配列番号6(バークホルデリア・セパシア)、配列番号7(*Cupriavidus necator*)、配列番号8(オスキラトリア属種 P C C 6 5 0 6)、配列番号9(パラバークホルデリア・フィマツム)のアミノ酸配列と少なくともとも $\geq 65\%$ 同一であり、

配列番号1の202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214位、または配列番号3の194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205位、または配列番号4の212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222位、または配列番号5の202、203、204、205、206、207、208、209、210位、または配列番号6の202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212位、または配列番号7の203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213位、または配列番号8の209、210、211、212、213、214、215、216、217位、または配列番号9の192、193、194、195、196、197、198、199、200、201位、の1つ以上のアミノ酸交換を特徴とし、アミノ酸交換がA210SまたはS212Aではない、

オキシドレダクターゼをコードするアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを対象とする。

さらなる好ましい実施形態では、配列番号1の210位および212位におけるアミノ酸交換は除外される。

【0064】

好ましい実施形態では、配列番号1(ジオバチルス属種 P A 9)、配列番号3(サーマス・サーモフィルス)、配列番号4(ストレプトミセス・グロビスポラス)、配列番号5(クロストリジウム・アミノブチリカム)、配列番号6(バークホルデリア・セパシア)、配列番号7(*Cupriavidus necator*)、配列番号8(オスキラトリア属種 P C C 6 5 0 6)、配列番号9(パラバークホルデリア・フィマツム)、配列番号10(ラルストニア・ピケッティ)のアミノ酸配列と少なくともとも $\geq 90\%$ 同一であり、

配列番号1の202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214位、または配列番号3の194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205位、または配列番号4の212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222位、または配列番号5の202、203、204、205、206、207、208、209、210位、または配列番号6の202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212位、または配列番号7の203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213位、または配列番号8の209、210、211、212、213、214、215、216、217位、または配列番号9の192、193、194、195、196、197、198、199、200、201位、または配列番号10の203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217位、の1つ以上のアミノ酸交換を特徴とし、アミノ酸交換がA210SまたはS212Aではない、

オキシドレダクターゼをコードするアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを対象とする。

【0065】

好ましい実施形態では、オキシドレダクターゼをコードするアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを対象とし、以下のアミノ酸配列と少なくともとも $\geq 30\%$ 同一である、

・202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214位の1つ以上のアミノ酸交換がされた配列番号1(ジオバチルス属種 P A 9)、

・ 194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205位の1つ以上のアミノ酸交換がされた配列番号3（サーマス・サーモフィルス）のまたは配列番号21、

・ 212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222位の1つ以上のアミノ酸交換がされた配列番号4（ストレプトミセス・グロビスポラス）または配列番号22、

・ 202、203、204、205、206、207、208、209、210位の1つ以上のアミノ酸交換がされた配列番号5（クロストリジウム・アミノブチリカム）または配列番号23、

・ 202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212位の1つ以上のアミノ酸交換がされた配列番号6（バークホルデリア・セパシア）または配列番号24、

・ 203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213位の1つ以上のアミノ酸交換がされた配列番号7（*Cupriavidus necator*）または配列番号25、

【0066】

・ 209、210、211、212、213、214、215、216、217位の1つ以上のアミノ酸交換がされた配列番号8（オスキラトリア属種PCC 6506）または配列番号26、

・ 192、193、194、195、196、197、198、199、200、201位の1つ以上のアミノ酸交換がされた配列番号9（パラバークホルデリア・フィマツム）または配列番号27、

・ 203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217位の1つ以上のアミノ酸交換がされた配列番号10（ラルストニア・ピケッティ）または配列番号28、アミノ酸交換がA210SまたはS212Aではない。

【0067】

好ましい実施形態は、配列番号11、配列番号12、配列番号13または配列番号14のアミノ酸配列と少なくとも $\geq 30\%$ 、 $\geq 40\%$ 、 $\geq 50\%$ 、 $\geq 60\%$ 、 $\geq 70\%$ 、 $\geq 80\%$ 、 $\geq 90\%$ 同一である、オキシドレダクターゼをコードするアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを対象とし、ここで、配列番号11、配列番号12、配列番号13および配列番号14は、207位またはアミノ酸配列の対応する位置に、L-バリン以外のタンパク質構成アミノ酸を有する。

【0068】

好ましい実施形態は、配列番号11、配列番号12、配列番号13または配列番号14のアミノ酸配列と少なくとも $\geq 90\%$ 、 $\geq 92\%$ 、 $\geq 94\%$ 、 $\geq 96\%$ 、 $\geq 97\%$ 、 $\geq 98\%$ 、 $\geq 99\%$ または 100% 、好ましくは $\geq 97\%$ 、特に好ましくは $\geq 98\%$ 、非常に特に好ましくは $\geq 99\%$ 、極めて好ましくは 100% 同一である、オキシドレダクターゼをコードするアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドであり、ここで、配列番号11、配列番号12、配列番号13および配列番号14は、207位またはアミノ酸配列の対応する位置に、L-バリン以外のタンパク質構成アミノ酸を有する。

【0069】

好ましい実施形態では、アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドは、配列番号11、配列番号12、配列番号13または配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32のアミノ酸配列と少なくとも $\geq 30\%$ 、 $\geq 40\%$ 、 $\geq 50\%$ 、 $\geq 60\%$ 、 $\geq 70\%$ 、 $\geq 80\%$ 、 $\geq 90\%$ 同一であるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドは、オキシドレダクターゼをコードする。

【0070】

好ましい実施形態では、配列番号11、配列番号12、配列番号13または配列番号1

10

20

30

40

50

4、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32のアミノ酸配列と少なくとも $\geq 90\%$ 、 $\geq 92\%$ 、 $\geq 94\%$ 、 $\geq 96\%$ 、 $\geq 97\%$ 、 $\geq 98\%$ 、 $\geq 99\%$ または 100% 、好ましくは $\geq 97\%$ 、特に好ましくは $\geq 98\%$ 、非常に特に好ましくは $\geq 99\%$ 、極めて好ましくは 100% 同一であるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドは、オキシドレダクターゼをコードする。

【実施例】

【0071】

例示的な実施形態を参照して、本発明を以下でより詳細に説明する。

実施例1：異なるHpaB（ジオバチルス属）変異体を用いた大腸菌株の産生

10

【0072】

プラスミドの完全な配列（シュドモナス・スタッツェリ（*Pseudomonas stutzeri*）AK61由来のシアニダーゼ遺伝子の配列を含む）が開示されているドイツ特許第102004043748A1号に以前に記載されているpOM17c-プラスミドを出発点として使用した。このプラスミド上の複製起点およびアンピシリン耐性遺伝子の配列を維持し、野生型ジオバチルス属種PA-9 hpaB遺伝子、野生型大腸菌hpaC遺伝子、シュドモナス・オレオボランス（*Pseudomonas oleovorans*）PalKBプロモータおよび大腸菌rrnBターミネータ配列、ならびにalkS転写調節遺伝子（Yuste et al., J Bacteriol. 1998 Oct; 180 (19): 5218-26）を付加した。このプラスミドを、ジオバチルス属種野生型シングルカッター制限酵素AgeIおよびPmlI [New England Biolabs GmbH, Bruningstrasse 50, Geb. B852, 65926 Frankfurt am Main]を用いて消化した。合成したDNA断片 [Eurofins Genomics Germany GmbH Anzinger Str. 7a DE-85560 Ebersberg] を、NEBuilder（登録商標）HiFi DNA Assembly Master Mix [New England Biolabs GmbH Bruningstrasse 50, Geb. B852 65926 Frankfurt am Main] を製造者の指示に従って使用して、プラスミド骨格でクローニングした。それにより、プラスミドは大腸菌hpaCおよび異なるhpaB変異体の両方を含有していた。NEB（登録商標）5- α エレクトロコンピテント大腸菌 [New England Biolabs GmbH Bruningstrasse 50, Geb. B852 65926 Frankfurt am Main] の形質転換後、細胞を、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含有するLB寒天に播種した。正確にクローニングされたプラスミドを選択するために、制限分析および配列決定を行った。言及される場合は、プラスミド安定化毒素-抗毒素配列hok/sok（Thisted, EMBO J. 1994 Apr 15; 13 (8): 1950-9）およびcer決定基（Summers & Sherratt, 1984, DOI: 10.1016/0092-8674(84)90060-6）をプラスミドに付加して、プラスミドの安定性を高めた。

20

30

【0073】

40

選択したプラスミドの形質転換のために、L-チロシン産生株DPD6021-Sを使用した。DPD6021-Sは、米国特許第7700328B2号に記載されている、pMT100プラスミドがさらに排除されたDPD4145のS期変異体である。プラスミド形質転換のために、株をLB一晚培養物から0, 05のOD₆₀₀まで接種し、0.7のOD₆₀₀まで増殖させた。氷上で30分間インキュベートした後、細胞を回収し（10分、5500g; 4°C）、50mlの脱塩水で2回洗浄した。1mlの予冷した10%（v/v）グリセロールを用いたさらなる洗浄工程の後、細胞を200 μl の予冷した10%（v/v）グリセロールに再懸濁し、40 μl のアリコート成形質転換に使用した。したがって、100ngのプラスミドをエレクトロポレーションキュベットに移し、40 μl の細胞溶液と混合し、Gene Pulser Xcellエレクトロポレーショ

50

ンシステム [Bio-Rad Laboratories GmbH, Kapellenstrasse 12, D-85622 Feldkirchen] において 2500 V、200 Ω および 25 μ F でパルスした。1 ml の SOC 培地を添加し、37 °C で 45 分間再生した後、100 μ l の懸濁液を、100 μ g/ml のアンピシリンを含有する LB 寒天に播種した。プラスミドを耐性コロニーから単離し、プラスミドの真正性を制限分析によって確認した。

【0074】

下記系統を生成した：

hpaBC_Ec:	E. coli hpaB (wildtype; 参照);	
hpaB_Gs:	Geobacillus sp. PA-9 hpaB (wildtype);	10
hpaB_V207L_Gs:	Geobacillus sp. PA-9 hpaB (Mutation V207L);	
hpaB_V207T_Gs:	Geobacillus sp. PA-9 hpaB (Mutation V207T);	
hpaB_V207Q_Gs:	Geobacillus sp. PA-9 hpaB (Mutation V207Q);	
hpaB_V207G_Gs:	Geobacillus sp. PA-9 hpaB (Mutation V207G);	
hpaB_V207T_K208R_Gs:	Geobacillus sp. PA-9 hpaB (Mutation V207T_K208R);	
hpaB_T206M_V207T_Gs:	Geobacillus sp. PA-9 hpaB (Mutation T206M_V207T);	
hpaB_T206A_V207T_Gs:	Geobacillus sp. PA-9 hpaB (Mutation T206A_V207T).	20
hpaB_V207T_A210S_T211N_S212T:	Geobacillus sp. PA-9 hpaB (Mutation V207T_A210S_T211N_S212T)	
hpaB_V207T_A210V_T211M_S212N:	Geobacillus sp. PA-9 hpaB (Mutation V207T_A210V_T211M_S212N)	
hpaB_V207T_G213A_E214Q_D215N:	Geobacillus sp. PA-9 hpaB (Mutation V207T_G213A_E214Q_D215N)	
hpaB_I152L_V207T:	Geobacillus sp. PA-9 hpaB (Mutation I152L_V207T)	

実施例 2：L-DOPA および L-チロシンの産生 (BioLector スクリーニングを使用)

【0075】

ジオバチルス属種 PA-9 遺伝子の野生型または突然変異型変異体を発現するプラスミドを有する DPD6021-S 株、ならびに野生型大腸菌遺伝子を発現する参照株を、BioLector [m2p-labs; Arnold-Sommerfeld-Ring 2, 52499 Baesweiler] 小規模試験系で試験した。

【0076】

したがって、バッフル付き振とうフラスコ中 10 ml LB 培地 (100 μ g/ml アンピシリン) において 37 °C、200 rpm で 18 時間、株を培養した。培養物を、1 ml の LB 培地、pH 5.5 (7.5 mM L-チロシン; 100 μ g/ml のアンピシリン; 0.25% (v/v) DCPK を添加) を含有する BioLector Flow er plate に播種して、0.1 の出発 OD₆₀₀ を得た。培養を、プロセスが停止するまで、37 °C、1200 rpm および 85% の相対湿度で 24 時間行い、高速液体クロマトグラフィ (HPLC) を使用して L-DOPA および L-チロシン濃度を測定した。

【0077】

HPLC は、Agilent 1200 (Agilent Technologies, Palo Alto, Calif.) で実施した。Inertsil ODS-3、5 μ m、4.6 $\times$ 150 mm カラム (Agilent Technologies) を使用した。使用した方法は、停止時間 18 分で 1.00 ml/分のカラム流量を必要とした。移動相は、表 1 に記載されるような溶媒 A (2.72 g/L KH₂PO₄、2.5 ml

10

20

30

40

50

／ L 濃リン酸、 4 0 m l ／ L アセトニトリル）と溶媒 B （アセトニトリル）との比率で構成された。

【 0 0 7 8 】

【表 1】

時 間 [min]	溶媒 A [%]	溶媒 B [%]
0	100	0
6.5	100	0
10	75	25
13	75	25
13.01	100	0
18	100	0

表 1：H P L C 分析のための移動相の組成

10

【 0 0 7 9 】

スペクトルを 1 0 0 n m から 3 8 0 n m まで走査し、 L - D O P A についてのシグナルを 2 9 0 n m 、 2 . 8 分の保持時間で記録し、 L - チロシンについてのシグナルを 2 7 8 n m 、 3 . 9 分の保持時間で記録した。

【 0 0 8 0 】

【表 2】

	L-DOPA [mM]	L-Tyrosin [mM]
LD-EC-12 [hpaBC_Ec]	2.7	5.4
hpaB_Gs	3.6	4.5
hpaB_V207Q_Gs	4.0	4.0
hpaB_V207T_Gs	4.3	3.6
hpaB_V207L_Gs	4.4	3.8

表 2：B i o L e c t o r スクリーニングを用いた単一変異体による L - D O P A および L - チロシンの産生

20

30

【 0 0 8 1 】

【表 3】

	L-DOPA [mM]	L-Tyrosin [mM]
hpaB_V207T_Gs	5.2	3.5
hpaB_T206M_V207T_Gs	6.4	2.2
hpaB_V207T_K208R_Gs	5.4	3.6
hpaB_V207G_Gs	4.4	4.4
hpaB_T206A_V207T_Gs	4.7	3.8
hpaB_V207T_A210S_T211N_S212T	4.0	4.5
hpaB_V207T_A210V_T211M_S212N	4.0	4.6
hpaB_V207T_G213A_E214Q_D215N	3.8	4.7
hpaB_I152L_V207T	4.0	5.0

40

【 0 0 8 2 】

表 3：B i o L e c t o r スクリーニングを用いた単一および複数の変異体による L -

50

DOPAおよびL-チロシンの産生（プラスミド安定化エレメントを含有するプラスミド）

【0083】

スクリーニングの結果を表2および表3に要約し、図1および図2に可視化する。図1は、BioLectorスクリーニングを用いた単一変異体によるL-DOPAおよびL-チロシンの産生を示し、図2は、BioLectorスクリーニングを用いた単一および複数の変異体によるL-DOPAおよびL-チロシンの産生を示す（プラスミドはプラスミド安定化エレメントを含有する）。

実施例3：L-DOPAおよびL-チロシンの産生（発酵プロセス）

【0084】

株DPD4145について米国特許第7700328B2号の実施例8に記載されているように発酵を行い、株をL-チロシンおよびL-DOPAの産生について評価した。米国特許第7700328B2号の実施例8とは異なり、IPTGではなくジシクロプロピルケトン（DCPK）で発酵を誘導し、pH6.8でアンピシリン（100mg/L）の存在下に発酵を行った。試料を定期的に発酵槽から取り出し、L-チロシン、L-DOPAおよびバイオマス濃度について分析した。結果を表4～6に要約しており、表4は48時間にわたるL-DOPAの産生を示し、表5は同じ発酵プロセスについて48時間にわたるL-チロシンの産生を示し、表6はL-DOPA/L-チロシンの比率を示す。結果を対応する図3～図4に可視化する。

【0085】

図3は、発酵プロセスを用いた大腸菌HpaB（上）およびジオバチルス属種HpaB（下）による48時間にわたるL-DOPAおよびL-チロシンの産生を示し、図4は、発酵プロセスを用いたジオバチルス属種HpaB V207T変異体（上）およびジオバチルス属種HpaB V207L変異体（下）による48時間にわたるL-DOPAおよびL-チロシンの産生を示す。

【0086】

【表4】

	L-DOPA [g/L]			
t [h]	hpaB_Ec	hpaB_Gs	hpaB_Gs_V207T	hpaB_Gs_V207L
0	0.0	0.0	0.0	0.0
18	8.2	4.3	7.2	7.3
25	11.4	10.6	13.9	13.1
48	15.3	13.7	21.4	20.3

表4：発酵プロセスを用いたL-DOPAの生産

【0087】

10

20

30

40

50

【表 5】

	L-Tyrosine [g/L]			
t [h]	hpaB_Ec	hpaB_Gs	hpaB_Gs_V207T	hpaB_Gs_V207L
0	0.0	0.0	0.0	0.0
18	2.0	3.6	2.5	2.7
25	1.4	3.0	1.1	1.3
48	3.4	1.9	below detection limit	0.5

表 5：発酵プロセスを用いた L-チロシンの生産

10

【0088】

【表 6】

	Ratio L-D/L-T			
t [h]	hpaB_Ec	hpaB_Gs	hpaB_Gs_V207T	hpaB_Gs_V207L
0				
18	4.0	1.2	2.9	2.7
25	8.2	3.5	12.9	9.7
48	4.5	7.1	L-tyrosine below detection limit	42.5

表 6：発酵プロセスを用いた L-DOPA / L-チロシンの比率

20

【0089】

ジオバチルス属由来の HpaB を野生型酵素として使用し、48 時間の L-DOPA の発酵生産のために異なる突然変異を用いることにより、L-DOPA / L-チロシンの比率が大腸菌野生型酵素を使用した場合よりも高いことを明確に示すことができた（表 6）。ジオバチルス属 HpaB 酵素の変異体は、さらに L-DOPA / L-チロシンの比率についてより高い値を有する。

30

【0090】

さらなる変異体 Gs_V207T-T206M および Gs_V207T-K208R も発酵プロセスで試験し、L-DOPA / L-チロシンの比率について高い値で同様の結果を得た。

実施例 5：構造相同性の分析

【0091】

本発明のオキシドレダクターゼに関して、ジオバチルス属種 HpaB 配列を使用して、構造相同体について蛋白質構造データバンク（Protein Data Bank）（PDB）を検索した。構造アラインメントは、MATT（Menke, M., Berger, B. & Cowen, L. Matt: Local Flexibility Aids Protein Multiple Structure Alignment. PLoS Comput. Biol. 4, e10 (2008)）を用いて構築した。

40

【0092】

本発明のオキシドレダクターゼについてのそのようなアラインメントを図 5 に示しており、これは、ジオバチルス属種 HpaB と 2yyj（サーマス・サーモフィルス由来のオキシドレダクターゼ）のアラインメントを示す。

50

【0093】

図6:Geobacillus sp. HpaB and 4oo2 (oxidoreductase from Streptomyces globisporus)のアラインメント。

【0094】

図7:Geobacillus sp. HpaB and 1uv8 (oxidoreductase from Clostridium aminobutyricum)のアラインメント。

【0095】

図8:Geobacillus sp. HpaB and 3hwc (oxidoreductase from Burkholderia cepacia)のアラインメント。

【0096】

図9:Geobacillus sp. HpaB and 4g5e (oxidoreductase from Cupriavidus necator)のアラインメント。

【0097】

図10:Geobacillus sp. HpaB and 4irn (oxidoreductase from Oscillatoria sp. PCC 6506)のアラインメント。

【0098】

図11:Geobacillus sp. HpaB and 5idu (oxidoreductase from Paraburkholderia phymatum)のアラインメント。

【0099】

図12:Geobacillus sp. HpaB and 6jhm (oxidoreductase from Ralstonia pickettii)のアラインメント。

モデル化された HpaB 構造の重ね合わせは、タンパク質が適切に整列していることを示している。

実施例6：異なるオキシドレダクターゼ変異体を用いた大腸菌株の産生

【0100】

酵素Ear I [New England Biolabs GmbH Bruningstrasse 50, Geb. B852 65926 Frankfurt am Main]を用いて野生型ジオバチルス属種PA-9 hpaB遺伝子および野生型大腸菌 hpaC遺伝子を担持する実施例1に記載のpOM17cプラスミドの制限を行って、野生型ジオバチルス属種PA-9 hpaB遺伝子、ならびにPalKB、alkS配列および大腸菌 hpaC配列の一部を除去する。得られたプラスミド骨格を、先に除去されたPalKBおよびalkS配列ならびに大腸菌 hpaC配列の一部、ならびに配列番号3（サーマス・サーモフィルス）、配列番号4（ストレプトミセス・グロビスポラス）、配列番号5（クロストリジウム・アミノブチリカム）、配列番号6（バークホルデリア・セパシア）、配列番号7（カプリアビダス・ネカトル）、配列番号8（オスキラトリア属種PCC 6506）、配列番号9（パラバークホルデリア・フィマツム）、配列番号10（ラルストニア・ピケティ）のアミノ酸配列を有する酵素をコードする遺伝子の野生型配列を含む合成DNA断片でクローニングする。

【0101】

さらに、前述のプラスミド骨格を、先に除去されたPalKBおよびalkS配列ならびに大腸菌 hpaC配列の一部、ならびに配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28のアミノ酸配列を有する、活性が改善された酵素変異体をもたらす遺伝子の変異配列を含む合成DNA断片でクローニングする。

得られたプラスミドを、実施例1に記載されるように、L-チロシン産生株DPD6021-Sの形質転換に使用する。

【0102】

得られた株を、実施例2に記載される小規模スクリーニング系または実施例3に記載される発酵で培養して、突然変異型酵素変異体を発現する株の変換率を評価する。L-DOPA形成を実施例1に記載されるように定量化する。全ての変異体についてL-DOPA

10

20

30

40

50

産生が検出された。

タンパク質配列

SEQ ID NO:1	Geobacillus sp. PA9 HpaB	
【 0 1 0 3 】		
SEQ ID NO:2	E.coli (HpaB) 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase oxygenase component	
SEQ ID NO:3	Thermus thermophilus	
SEQ ID NO:4	Streptomyces globisporus	
SEQ ID NO:5	Clostridium aminobutyricum	
SEQ ID NO:6	Burkholderia cepacia	10
SEQ ID NO:7	Cupriavidus necator	
SEQ ID NO:8	Oscillatoria sp. PCC 6506	
SEQ ID NO:9	Paraburkholderia phymatum	
SEQ ID NO:10	Ralstonia pickettii	
SEQ ID NO:11	Geobacillus sp. PA9 HpaB V207L	
SEQ ID NO:12	Geobacillus sp. PA9 HpaB V207T	
SEQ ID NO:13	Geobacillus sp. PA9 HpaB V207Q	
SEQ ID NO:14	Geobacillus sp. PA9 HpaB V207G	
SEQ ID NO:15	Geobacillus sp. PA9 HpaB T206M	
SEQ ID NO:16	Geobacillus sp. PA9 HpaB T206A	20
SEQ ID NO:17	Geobacillus sp. PA9 HpaB K208R	
SEQ ID NO:18	Geobacillus sp. PA9 HpaB V207T_K208R	
SEQ ID NO:19	Geobacillus sp. PA9 HpaB T206M_V207T	
SEQ ID NO:20	Geobacillus sp. PA9 HpaB T206A_V207T	
SEQ ID NO:21	Thermus thermophilus (mutated)	
SEQ ID NO:22	Streptomyces globisporus (mutated)	
SEQ ID NO:23	Clostridium aminobutyricum (mutated)	
SEQ ID NO:24	Burkholderia cepacia (mutated)	
SEQ ID NO:25	Cupriavidus necator (mutated)	
SEQ ID NO:26	Oscillatoria sp. PCC 6506 (mutated)	30
SEQ ID NO:27	Paraburkholderia phymatum (mutated)	
SEQ ID NO:28	Ralstonia pickettii (mutated)	
SEQ ID NO:29	Geobacillus sp. PA9 HpaB V207T_A210S_T211N_S212T	
SEQ ID NO:30	Geobacillus sp. PA9 HpaB V207T_A210V_T211M_S212N	
SEQ ID NO:31	Geobacillus sp. PA9 HpaB V207T_G213A_E214Q_D215N	
SEQ ID NO:32	Geobacillus sp. PA9 HpaB I152L_V207T	

40

50

【図 5】

HpaB: 5 AKTGKEYMERLKQAKSSVYIHGEKVEDVTVHPAFRNVRSMAALYDRQYKEPEKMLYRSPT--TGQPVG
2yyj: 2 ARTGAEYIEALKTRPNNLWYKGEKVEDPTTHPVFRGIVRTMAALYDLQHDPRYREVLTVEEGKRHQMSF

HpaB: 75 IQPTTIDELIARREATQEWARMSAGMMGRSPDYLNAEVMAMGIANDLFAEDDPMFAENAKNYEYAREHD
2yyj: 72 LIPKTKEDLKRKGQYLWADQNLGMMGRSPDYLNNAVMAASADYFGE---FAENVRNRYRLRDQD

HpaB: 145 ISLTHLTlHPQMNRAKALHEQNDADVPLHLVERRKDGIIVSGIRLLATQGGITDEILVFPSTVKKATSGE
2yyj: 138 LATHTALTNPQVNRARPPSGQPDPIPVGVKQTEKGIIVRGARMTATFP-LADEVLIFPSTLLQAGS--

HpaB: 215 DPYALFAIPNNTPGVKFICREAFDYGRSANDHPLASRFEEDAIVSFENVFVWVRFVCGNSSICNRT
2yyj: 205 EKYALFALPTSTPLGHFVCREALVGGDSPFDHPLSSRVEEMDCLVIFDDVLVPWERVFI LGNVELCNNA

HpaB: 285 FRETNAVVMHSHQVAKNIVKTEFLLGVTCLLIEAIGIGEFQHVKDGAETMLVLETMKSHLYRAEHNAK
2yyj: 275 YAATGALNMHAHQVVALKTAKEAFLGVAAALMAEGIGADVYGVHQQEIAEIIIVYLEAMRAFWTRAEEAAK

HpaB: 355 RDRWGTMTPDFAALDAARNWYPRIPRLAEIIRILGASGLMAIPTEADFQHEEIGDIVRRAMQGATVDGY
2yyj: 345 ENAYGLLVDPRGALDGAARNLYPRLYPREILEQIGASGLITLPSKDFKG-PLGPFLEKFLQGAALCAK

HpaB: 425 ERVQLFRLAWDLTMSAFGARQTHYIEYFFGDPVRMGMAVFDGYKEPKYQFVREFLRGAKSVFIPADNKH
2yyj: 414 ERVALFRLAWDMTILSGFGARQELYERFFGDPVRMYQTYLVNWNKEPKYKERIRAFI-----KESLK

図 5：ジオバチルス属種 H p a B と 2 y y j （サーマス・サーモフィルス由来のオキシドレダクターゼ）のアラインメント。

【図 7】

HpaB: 4 PAKTGKEYMERLKQAKSSVYIHGEKVEDVTVHPAFRNVRSMAALYDRQYKEPEKMLYRSPT--TGQPVG
1uv8: 1 MLMTAEQYIESLRKLNTRVVMFGEKIEIENWDHPIRPSINCVRMITYELAQQPQYADLMTTKSLNIGKTIN

HpaB: 72 MTFIQPTTIDELIARREATQEWARMSAGMMGRSPDYLNAEVMAMGIANDLFAE-DDPMFAENAKNYEYA
1uv8: 71 RFANLHQSDDLRKKVKMQRLLGQKTA--SCFQRVGMDFNAVFSTTYEIDQKVGTYNHYKNFTEVLKYI

HpaB: 141 REHDISLTHLTlHPQMNRAKALHEQNDADVPLHLVERRKDGIIVSGIRLLATQGGITDEILVFPSTVKKKA
1uv8: 139 QENDLIVDGMTDPKGDRLAPSAQKDPDLFRIVEKREDGIVVRGAHAQTGSINSHEIIMPT----I

HpaB: 211 TSG--EDPYALFAIPNNTPGVKFICRE--FDYG--SSANDHPLASRFEEDATVSFENVFVWVRFVCGN
1uv8: 205 AMTEADKDYAVSFACPSDADGLFMIVGRQSCDTRKMEEGADIDLGN-KQFGGQALVVFQNVFIPNDRI

HpaB: 274 VCGNSSICNRTFRETNAVVMHSHQVAKNIVKTEFLLGVTCLLIEAIGIGEFQHVKDGAETMLVLETMK
1uv8: 274 LCQEYDFAGMMVE--RFAGYHRQSYGGCKVGVGDVIGAAALADYNGAKASHVKDKLIEMTHNETLY

HpaB: 344 SHLYRAEHNAKDRWGTMTPDFAALDAARNWYPRIPRLAEIIRILGASGLMAIPTEADFQHE-----
1uv8: 342 CCGTACSAEGYPTAAGNYQIDLLANVCKQNIITRFYIVRLAEDIAGGLMVTMPSEADFKESTVVGDRG

HpaB: 407 -EIGDIVRRAMQGA-TVDGYERVQLFRLAWDLTMSAFGARQTHYIEYFFGDPVRMGMAVFDGYKEPKYQ
1uv8: 412 ETIGDFCNKFFAAAPCTCTTEERMRVLRFENLICLICASAVGYRTESMHGAGSPQAQRIMIAQQGNINAKKE

HpaB: 475 FVREFLRGAKSVFIPADNKH
1uv8: 482 LAKAI-----AGIK

図 7：Geobacillus sp. HpaB と 1uv8 (oxidoreductase from Clostridium aminobutyricum)のアラインメント。

【図 6】

HpaB: 3 MPAKTGKEYMERLKQAKSSVYIHGEKVEDVTVHPAFRNVRSMAALYDRQYKEPEKMLYRSPT--TGQPV
4oo2: 18 TRPLTGEEYLESLR-DAREVYLDGSRVKDVTAHPAFHNPARTARLYDSLHDPAQKAVLTAPTADAGDGT

HpaB: 71 GMTFIQPTTIDELIARREATQEWARMSAGMMGRSPDYLNAEVMAMGIANDLFAEDDPMFAENAKNYEYA
4oo2: 87 HRFFTAPRSVDDLKQDQAAIASMARKSYGNMGRSPDYKASFLGTLGANADFYEP---FADNARRMYRES

HpaB: 141 REHDISLTHLTlHPQMNRAKALHEQNDADVPLHLVERRKDGIIVSGIRLLATQGGITDEILVFPSTVKKKA
4oo2: 153 QEKVLYWNHAFLHPVD-----RSEVGDFVIFHVERETDAGLVVSGAKVATGSALTHAAFISSH----G

HpaB: 211 TSGED-PYALFAIPNNTPGVKFICREAFD-YGR---SANDHPLASRFEEDATVSFENVFVWVRFVCGN
4oo2: 217 LPIKDRKFALVATVPMDADGLKVICRPSYANAASTGSPFDNPLSSRLDENDAILVLDQVLIPWENVFVY

HpaB: 276 GNSICNRTFRETNAVVMHSHQVAKNIVKTEFLLGVTCLLIEAIGIGEFQHVKDGAETMLVLETMKSH
4oo2: 287 GNLGKVHLLAGQSGMIERATFHGCTRLAVKLEFIAGLLAKALDITGAKDFRGVQTRLGEVLAWRNLFWSL

HpaB: 346 LYRAEHNAKDRWGTMTPDFAALDAARNWYPRIPRLAEIIRILGASGLMAIP-TEADFQHEEIGDIVRR
4oo2: 357 SDAARNPVPKNGTLLPNPQAGMAYRWFQIGYPRVLEIVQQDVASGLMYNVNSTEDFRNPETGPYLEK

HpaB: 415 AMQGA-TVDGYERVQLFRLAWDLTMSAFGARQTHYIEYFFGDPVRMGMAVFDGY-----EKEPKYQFVREF
4oo2: 427 YLRGSDGAGAVERVKMKLMDAVGSDFGGRHLEYERNYSNGHENTRIELLSSQTASGLDSYMDFAQAC

HpaB: 480 LRGA----KSVFIPA
4oo2: 497 MDEYLDGWTAPDLES

図 6：Geobacillus sp. HpaB と 4oo2 (oxidoreductase from Streptomyces globisporus)のアラインメント。

【図 8】

HpaB: 5 AKTGKEYMERLKQAKSSVYIHGEKVEDVTVHPAFRNVRSMAALYDRQYKEPEKMLYRSPT--TGQPVGMT
3hwc: 3001 MRTGKQYLES LN-DGRVVMVGNKEIDNVATHPLTRDYAERVAQFYDLHHRPDLQDVLTVADAGVRRSRQ

HpaB: 74 FTQPTTIDELIARREATQEWARM-SAGMMGRSPDYLNAEVMAMGIANDLFAE-----DDPMFAENAKNY
3hwc: 3070 WQDPKDAAGLRVKRYKHYETILREIAAGSYGRLPDHNYTFTTYADDPWEVKQSIGAEGRNLQNIHNL

HpaB: 138 EYAREHDISLTHLTlHPQMNRAKALHEQNDADVPLHLVERRKDGIIVSGIRLLATQGGITDEILVFPSTV
3hwc: 3140 KLLREKDLNCLNFVDPQTDSS--DAAQARSPLNRIZVEKTDGIIVNGKAVGTGAFGDYMHIGCL--

HpaB: 208 KKATSGEDPYALFAIPNNTPGVKFICREAFDYGRSANDHPLASRFEEDATVSFENVFVWVRFVCGN
3hwc: 3206 -YRPGIPGEQVIFAIPNTPGVTFCRESTVKNOP-AEHPLASQGDDELSTTVFQNVFIPWEQVFIHGN

HpaB: 278 SSICNRTFRETNAVVMHSHQVAKNIVKTEFLLGVTCLLIEAIGIGEFQHVKDGAETMLVLETMKSHLY
3hwc: 3274 PEHAKLYPQ--RIFDWHYHILIRQVLAELIVGLAILTEHIGSKLPTVSARVAKLVAFHLMQAHLI

HpaB: 348 RAEHNAKDRWGTMTPDFAALDAARNWYPRIPRLAEIIRILGASGLMAIPTEADFQHEEIGDIVRRAMQ
3hwc: 3342 ASEETGHTKGRYKPNPLIVDFGRAHFLQNMQSMHYELDLAGRSSLMPSEGQNDQSSGQMFVKLNN

HpaB: 418 GATVDGYERVQLFRLAWDLTMSAFGARQTHYIEYFFGDPVRMGMAVFDGYKEPKYQFVREFLRGAKSVF
3hwc: 3412 GPKGNPRERVQIGRVIRDLVLTWGGRRQFMFENGTPLFAVFAATMTRDDMSAAGTYGKFASQV-----

HpaB: 488 IPADNKH
3hwc: 3477 ---CGIE

図 8：Geobacillus sp. HpaB と 3hwc (oxidoreductase from Burkholderia cepacia)のアラインメント。

【図 9】

HpaB: 5 AKTGKEYMERLKQAKSSVYIHGEKVEDVTVHFAFRNVVRSMALYDRQYKEPEKMLYRSP-TGQPVGMT
4g5e: 2 IRTGKQYLES LN-DGRNVWVGNEKIDNVATHPKTRDYAQRHADFYDLHHRPDLQDVMTFVDKDGERRTMQ

HpaB: 74 FIQPTTIDELIARREATQEWARM-SAGMMGRSPDYLNAEVMAMGIANDLFAE-----DDPMFAENAKNYY
4g5e: 71 WFGHYDKEQLRRKKRYHETIMREMAGASFRTPDVNNVLTQYIDDPSPWETQTIGAEKVKAKNIVDFV

HpaB: 138 EYAREHDISLTHLTHPQMRKALHEQNADVPLHLVERRKDGIIVSGIRLLATQGGITDEILVFPSTV
4g5e: 141 NFAKKHDLNCAQFVDPQM-----PGLRVIEKNDKGIVVSGVKAIGTGVAFADWIHIQV--

HpaB: 208 KKATSGEDPYALAFIPNNTPGVKFICREAFDYGRSANDHPLASRFEEDAIVSFENVFVPMERVFVCGN
4g5e: 207 -FRPGIPGDQIIFAATPVNTPGVTVICRESVVKEDP-IEHPLASQGDLDGMTVFDNVFIPWSHVFHLGN

HpaB: 278 SSICNRTFRETNNAVHMSHQVAKNIVKTEFLGVTLCLEAIGIGEFQHVKDKGAEIMLVETMKSHLY
4g5e: 275 PEHAKLYPQ--RVFDWLHYHALIRQSVRAELMAGLAITEHIGTNKIPAVQTRVAKLIGFHQAMLAHIV

HpaB: 348 RAEHNAKDRWGMTPTDFAALDAARNWYPRIPRLAEIIRILGASGLMAIPTEADFQHEEIGDIVRRAMQ
4g5e: 343 ASEELGFHTPGGAYKNILYDFGRALYENFSQMIYELVDLSGRSALIFASEDQNDDEALNGWFERMNN

HpaB: 418 GATVDGYERVQLFR LAWDLTMSAFGARQTHYEYFFGDPVRMGMAFYDGYEKPQYVREFLRGAKSVF
4g5e: 413 GPVGPQPHDRVKIGRIRDLFLTOWGNRLFVFENFNGTLPQAIRMLTMQRAEFSAAQPYGT LARKV-----

HpaB: 488 IPADNKH
4g5e: 478 ---CGIE

図 9：Geobacillus sp. HpaB と 4g5e (oxidoreductase from Cupriavidus necator)のアラインメント。

【図 1 1】

HpaB: 5 AKTGKEYMERLKQAKSSVYIHGEKVEDVTVHFAFRNVVRSMALYDRQYKEPEKMLYRSP-TGQPVGMT
Sidu: 16 FFEARHRELAAGIEAWTQHLACVQHD-----DTDTTCRKLVRALGEAGNL-----KYGV

HpaB: 75 IQPTTIDE--LIARREATQEWARMSAGMM-----RSPDYLNAEVMAMGIANDLFAEDDPMFAENAKNYY
Sidu: 66 GGAQYGGHGTIDTRAVCLLRETLANHDLADFALAMQSLGSAITLA-----GTHEQK

HpaB: 138 EYAREHD-----ISLTHLTHPQMRKALHEQNADVPLHLVERRKDGIIVSGIRLLATQGGITDEILVFPST
Sidu: 120 IRYLPRVSKGEATIAAFALSEPDAQSDVAAM-----SLQA-RAEGDCVVIDGKTWISNGGIADFVYVF

HpaB: 204 PSTVKKATSGEDPYALAFIPNNTPGVKFICREAFDYGRSANDHPLASRFEEDAIVSFENVFVPMERVFVCG
Sidu: 182 ARTGEAPGARG---ISAFIVDADTPGLQIAERIDVIA-----PHPLARLHFDSARVPRSQM

HpaB: 273 FVCGNSSICNRTFRETNNAVHMSHQVAKNIVKTEFLGVTLCLEAIEI-----GIGEFQHVKDKGAEIML
Sidu: 235 LGAPG--EGFKIAM--RTLVDVFTSVAAASLGFARRALQEGLARAASRKMFGQTLGDFQLTQT LQAQMAL

HpaB: 338 VLETMKSHLYRAEHNAKDRWGMTPTDFAALDAARNWYPRIPRLAEIIRILGASGLMAIPTEADFQHEE
Sidu: 301 TIDSSALLVYRAAKLRDQ-----GENVTREAMAKWHASEGAQQVIDAAVQLWGMQGVQ-----

HpaB: 408 IGDIVRRAMQGATVDGYERVQLFR LAWDLTMSAFGARQTHYEYFFGDPVRMGMAFYDGYEKEPYKQ
Sidu: 356 -----GTTVERLY-----REIRALRIYEGATEVQQLTVGRDLLKAHAQ

図 1 1：Geobacillus sp. HpaB と Sidu (oxidoreductase from Paraburkholderia phymatum)のアラインメント。

【図 1 0】

HpaB: 33 TVHFAFRNVVRSMALYDRQYKEPEKMLYRSP-TGQPVGMT
4irn: 4 ANNSQIQFRKKVIQFAQQSLISDLIKNDKEEINFNRDAWQKCEFGVHGWP IPARYGGQELDILTAYAL

HpaB: 91 QEWARMSAGMM-GRSPDYLNAEVMAMGIANDLFAEDDPMFAENAKNYYEYAREHD-----ISLTHLTHPQ
4irn: 74 QGLGYGCKDGLIFAMNAHINACEPMLTFT-----GTEEQKEKYLPLLCRGWIA SHAATEPQ

HpaB: 156 MNRKALHEQNADVPLHLVERRKDGIIVSGIRLLATQGGITDEILVFPSTVKKATSGEDPYALAFIPN
4irn: 132 AGSDIYSL-----KTTA-QKDGDKYILNGYKHYVTNGTIADLFIIFATIDP---SLGKEGLTTFMIEK

HpaB: 226 NTPGVKFTICREAFDYGRSANDHPLASRFEEDAIVSFENVFVPMERVFVCGNSSICNRTFRETNNAVHMS
4irn: 191 DTPGLILSKPISKMG-----RTAEVPELLENCEVSAANRLGEEG--TGLAIFN--HSMEMER

HpaB: 296 HQVVAKNIVKTEFLGVTLCLEAIEI-----IGEFQHVKDKGAEIMLVETMKSHLYRAEHNAKDRWGT
4irn: 246 GFILAAAVGTMERLLEQSI RYARSHKQFGQAIGK FQLVANKLVEMKLRLENAKAYKVAWPKEN-----

HpaB: 361 NTPDFAALDAARNWYPRIPRLAEIIRILGASGLMAIPTEADFQHEEIGDIVRRAMQGATVDGYERVQLF
4irn: 311 KQMALLEASMANLYISEAWQSCLEAIEIHGAYGYLT-----N

HpaB: 431 RLAWDLTMSAFGARQTHYEYFFGDPVRMGMAFYDGYE
4irn: 349 TELEREL-----RDAISKFYSGTSEIQRVVIAKFLG

図 1 0：Geobacillus sp. HpaB と 4irn (oxidoreductase from Oscillatoria sp. PCC 6506)のアラインメント。

【図 1 2】

HpaB: 4 PAKTGKEYMERLKQAKSSVYIHGEKVEDVTVHFAFRNVVRSMALYDRQYKEPEKMLYRSP-TGQPVGMT
6jhm: 1 MIRTGTQYLES LN-DGRNVWVGNEKIDNVATHPKTRDYAQRHADFYDLHHRPDLQDVMTYIDEGGQRRAM

HpaB: 73 TFIQPTTIDELIARREATQEWARM-SAGMMGRSPDYLNAEVMAMGIANDLFAE-----DDPMFAENAKNY
6jhm: 70 QWGHDRKEQLRRKKRYHETVMREMAGASFRTPDVNNVLTQYIDDPAPWETQSIGDDGHKAGKIVDF

HpaB: 137 YEYAREHDISLTHLTHPQMRKALHEQNADVPLHLVERRKDGIIVSGIRLLATQGGITDEILVFPST
6jhm: 140 IRYAREHDNCAQFVDP-----QE---RSPGLRVVEKNEKGIIVNGVKAIGTGVAFADWIHIQV--

HpaB: 207 VKKATSGEDPYALAFIPNNTPGVKFICREAFDYGRSANDHPLASRFEEDAIVSFENVFVPMERVFVCG
6jhm: 207 -FRPGIPGDQIIFAATPVNTPGVTVICRESLVKDDK-VEHPLAAQGDLDGMTVFENVFIPWSHVFHIG

HpaB: 277 NSSICNRTFRETNNAVHMSHQVAKNIVKTEFLGVTLCLEAIGIGEFQHVKDKGAEIMLVETMKSHL
6jhm: 274 NPNHAKLYPQ--RVFDWLHYHALIRQSVRAELVAGLAVLITEHIGTNKIPAVQTRVAKLIGFHQAMLAHL

HpaB: 347 YRAEHNAKDRWGMTPTDFAALDAARNWYPRIPRLAEIIRILGASGLMAIPTEADFQHEEIGDIVRRAM
6jhm: 342 IASEELGFHTPGGHYKNILYDFGRALYENFSQMIYELVDLSGRSALIFASEDQNDKDLNGWFERMNN

HpaB: 417 QGATVDGYERVQLFR LAWDLTMSAFGARQTHYEYFFGDPVRMGMAFYDGYEKEPYKQVREFLRGA
6jhm: 412 NGPVGRPHDRVKIGRIRDLFLTOWGSRRLFVFENFNGTLPQGRMLTMQRAEFSGSGPYKGLARQV---

HpaB: 484 KSVFIPADNKH
6jhm: 478 -----CGID

図 1 2：Geobacillus sp. HpaB と 6jhm (oxidoreductase from Ralstonia pickettii)のアラインメント。

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/069597

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N9/02 C12N15/53 C12P13/22 ADD.				
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) C12N C12P				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, Sequence Search, EMBASE, BIOSIS, WPI Data, CHEM ABS Data				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
Y	JUN YAO ET AL: "Developing a highly efficient hydroxytyrosol whole-cell catalyst by de-bottlenecking rate-limiting steps", NATURE COMMUNICATIONS, vol. 11, no. 1, 23 March 2020 (2020-03-23) , XP055755459, DOI: 10.1038/s41467-020-14918-5 page 2, left-hand column, last paragraph - right-hand column, last line; figure 1; table 1 ----- -/--	1,5-8, 10,11, 13-15, 17,18		
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.				
* Special categories of cited documents : <table border="0"> <tr> <td> "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 doubt 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 </td> <td> "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 </td> </tr> </table>			"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 doubt 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
"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 doubt 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		
17 September 2021		08/10/2021		
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Wiame, Ilse		

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/069597

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE UniProt [Online] 22 February 2012 (2012-02-22), "SubName: Full=4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase oxygenase component {ECO:0000313 EMBL:AEV20697.1}"; XP055755964, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:G8N7J9 Database accession no. G8N7J9 sequence	2-4,9,12
A	----- SEONG-HOON KIM ET AL: "Crystal Structure of the Oxygenase Component (HpaB) of the 4-Hydroxyphenylacetate 3-Monooxygenase from Thermus thermophilus HB8", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 282, no. 45, 5 September 2007 (2007-09-05), pages 33107-33117, XP055756118, US ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M703440200 the whole document	1-3
X	----- HAWUMBA J F ET AL: "Cloning and Characterization of a 4-Hydroxyphenylacetate 3-Hydroxylase From the Thermophile Geobacillus sp. PA-9", CURRENT MICROBIOLOGY, SPRINGER-VERLAG, NE, vol. 55, no. 6, 5 September 2007 (2007-09-05), pages 480-484, XP019561503, ISSN: 1432-0991, DOI: 10.1007/S00284-007-9016-5 the whole document	16
Y	-----	1,5-8, 10,11, 13-15, 17,18

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)**C 1 2 N 1/21****C 1 2 P 13/22 (2006.01)****C 1 2 P 13/22**

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N
G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 トビアス ブラッター

ドイツ連邦共和国 4 5 1 3 0 エッセン ミューラーブレスロー シュトラーセ 3 0

(72)発明者 ステファン オブワルド

ドイツ連邦共和国 6 1 1 3 0 ニッデラウ メイ ペクスタイン シュトラーセ 5

(72)発明者 ロナルド マーサ

ドイツ連邦共和国 3 3 6 5 9 ビーレフェルト ハフネルウエグ 1 7

(72)発明者 ボ ロジャー スヴェンソン

スウェーデン王国 2 2 4 7 2 ルンド リオングラーンデン 6 1

(72)発明者 デレク トーマス ローガン

スウェーデン王国 2 4 7 6 4 ベベロド ベベロド 6 7 1

(72)発明者 ルディー パンジャイタン

フランス共和国 9 4 7 0 0 メゾン アルフォート 1 5 ル ヘンリ レグナルト

(72)発明者 マチュー ニュ ファ チョン

フランス共和国 9 2 1 7 0 ヴァンヴ 2 7 アヴェニュー ドゥ ヴェルダン

F ターム (参考) 4B064 AE29 CA02 CA19 CC24 DA01

4B065 AA24X AA24Y AA26X AA26Y AA41X AA41Y AB01 AC14 BA02 CA44