



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118302528 A

(43) 申请公布日 2024.07.05

(21) 申请号 202280076375.9

(22) 申请日 2022.11.16

(30) 优先权数据

2021-186329 2021.11.16 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.05.16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2022/042624 2022.11.16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/090378 JA 2023.05.25

(71) 申请人 花王株式会社

地址 日本

(72) 发明人 辻幸盛 野中镜士朗 高桥史员

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322

专利代理师 龙淳 沈央

(51) Int.Cl.

C12N 15/60 (2006.01)

C12N 1/15 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

C12N 9/88 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12P 13/22 (2006.01)

权利要求书2页 说明书16页
序列表(电子公布)

(54) 发明名称

二羟基苯丙氨酸的制造方法

(57) 摘要

本发明提供使用微生物的培养菌体由原儿茶酸高效地制造3,4-二羟基苯丙氨酸的方法。该3,4-二羟基苯丙氨酸的制造方法包括:使生产原儿茶酸脱羧酶和酪氨酸酚裂解酶的微生物的培养菌体或其破碎物或者该微生物的菌体提取物与原儿茶酸、丙酮酸和铵盐进行接触反应的工序。

1. 一种3,4-二羟基苯丙氨酸的制造方法,其中,包括:
使生产原儿茶酸脱羧酶和酪氨酸酚裂解酶的微生物的培养菌体或其破碎物或者该微生物的菌体提取物与原儿茶酸、丙酮酸和铵盐进行接触反应的工序。
2. 如权利要求1所述的方法,其中,微生物具有编码原儿茶酸脱羧酶和酪氨酸酚裂解酶的基因。
3. 如权利要求2所述的方法,其中,微生物还具有编码黄素单核苷酸异戊烯基转移酶的基因。
4. 如权利要求2或3所述的方法,其中,基因中的至少1个为外来基因。
5. 如权利要求1~4中任一项所述的方法,其中,酪氨酸酚裂解酶是通过原儿茶酸的活性抑制率为91%以下的酪氨酸酚裂解酶。
6. 如权利要求1~5中任一项所述的方法,其中,酪氨酸酚裂解酶是选自以下的(B1)、(B2)、(C1)、(C2)、(D1)和(D2)中的蛋白质,
(B1)由序列编号2所示的氨基酸序列构成的蛋白质;
(B2)由与序列编号2所示的氨基酸序列具有至少90%以上的同一性的氨基酸序列构成且具有酪氨酸酚裂解酶活性的蛋白质;
(C1)由序列编号4所示的氨基酸序列构成的蛋白质;
(C2)由与序列编号4所示的氨基酸序列具有至少90%以上的同一性的氨基酸序列构成且具有酪氨酸酚裂解酶活性的蛋白质;
(D1)由序列编号6所示的氨基酸序列构成的蛋白质;
(D2)由与序列编号6所示的氨基酸序列具有至少90%以上的同一性的氨基酸序列构成且具有酪氨酸酚裂解酶活性的蛋白质。
7. 如权利要求6所述的方法,其中,酪氨酸酚裂解酶为所述(B1)或(B2)的蛋白质。
8. 如权利要求1~7中任一项所述的方法,其中,原儿茶酸是以糖类为原料制造得到的。
9. 如权利要求1~8中任一项所述的方法,其中,包括从反应溶液中回收3,4-二羟基苯丙氨酸的工序。
10. 一种载体或DNA片段,其中,包含编码原儿茶酸脱羧酶和酪氨酸酚裂解酶的多核苷酸。
11. 如权利要求10所述的载体或DNA片段,其中,还包含编码黄素单核苷酸异戊烯基转移酶的多核苷酸。
12. 如权利要求10或11所述的载体或DNA片段,其中,酪氨酸酚裂解酶为选自以下的(B1)、(B2)、(C1)、(C2)、(D1)和(D2)中的蛋白质,
(B1)由序列编号2所示的氨基酸序列构成的蛋白质;
(B2)由与序列编号2所示的氨基酸序列具有至少90%以上的同一性的氨基酸序列构成且具有酪氨酸酚裂解酶活性的蛋白质;
(C1)由序列编号4所示的氨基酸序列构成的蛋白质;

(C2) 由与序列编号4所示的氨基酸序列具有至少90%以上的同一性的氨基酸序列构成且具有酪氨酸酚裂解酶活性的蛋白质；

(D1) 由序列编号6所示的氨基酸序列构成的蛋白质；

(D2) 由与序列编号6所示的氨基酸序列具有至少90%以上的同一性的氨基酸序列构成且具有酪氨酸酚裂解酶活性的蛋白质。

13. 一种转化细胞, 其中,

含有权利要求9~12中任一项所述的载体或DNA片段。

14. 如权利要求1~9中任一项所述的方法, 其中,

微生物为权利要求13所述的转化细胞。

二羟基苯丙氨酸的制造方法

技术领域

[0001] 本发明涉及二羟基苯丙氨酸的制造方法。

背景技术

[0002] 3,4-二羟基-L-苯丙氨酸(L-DOPA)是在某种植物(例如刺毛黧豆)或哺乳类的体内生物合成的化合物。在哺乳类中,作为非必须氨基酸的L-酪氨酸被酪氨酸羟化酶羟化而变成L-DOPA,进而通过L-DOPA脱羧酶被转化为神经递质多巴胺。即L-DOPA是多巴胺的前体。另外,L-DOPA能够通过血脑屏障,因此也可以用作帕金森病的治疗药物。

[0003] 以往,作为L-DOPA的制造方法,已知有以香草醛为原料的化学合成法、和使用微生物所具有的酶系的方法等,作为廉价且有效的方法,报道有使具有 β -酪氨酸酶(酪氨酸酚裂解酶)活性的欧文氏菌属微生物的培养物与儿茶酚、丙酮酸和铵离子、或者与儿茶酚和L-丝氨酸进行接触反应来制造的方法(例如、专利文献1)。

[0004] 另一方面,莽草酸途径是植物和微生物生物合成芳香族化合物的重要的代谢途径。在莽草酸途径中,在碳6元环的形成后继续进行双键的形成,但已知从由3-脱氢莽草酸衍生的原儿茶酸生产没食子酸、儿茶酚等的芳香族化合物。

[0005] 现有技术文献

[0006] 专利文献

[0007] 专利文献1:日本专利第3116102号公报

发明内容

[0008] 本发明涉及以下的1)~3)。

[0009] 1)一种3,4-二羟基苯丙氨酸的制造方法,其中,包括:使生产原儿茶酸脱羧酶和酪氨酸酚裂解酶的微生物的培养菌体或其破碎物或者该微生物的菌体提取物与原儿茶酸、丙酮酸和铵盐进行接触反应的工序。

[0010] 2)一种载体或DNA片段,其中,包含编码原儿茶酸脱羧酶和酪氨酸酚裂解酶的多核苷酸。

[0011] 3)一种转化细胞,其中,含有上述2)的载体或DNA片段。

具体实施方式

[0012] 本发明涉及提供使用微生物的培养菌体等从原儿茶酸高效地制造3,4-二羟基苯丙氨酸的方法。

[0013] 本发明的发明人发现了不易受到原儿茶酸抑制的酪氨酸酚裂解酶,通过使用生产原儿茶酸脱羧酶和该酪氨酸酚裂解酶的微生物,能够高效地从原儿茶酸制造3,4-二羟基苯丙氨酸。

[0014] 根据本发明,能够从原儿茶酸高效地制造3,4-二羟基苯丙氨酸。由于原儿茶酸经由莽草酸途径生成,所以根据本发明,能够以生物质糖为原料生产3,4-二羟基苯丙氨酸。

[0015] 在本发明中,氨基酸序列或核苷酸序列的同一性通过Lipman-Pearson法(Science,1985,227:1435-1441)计算。具体而言,通过使用遗传信息处理软件GENETYX Ver.12的同源性分析(Search homology)程序,以比较单位大小(Unit size to compare)(ktup)为2进行分析而算出。

[0016] 在本发明中,关于氨基酸序列和核苷酸序列的“至少90%的同一性”是指90%以上、优选95%以上、更优选为96%以上、进一步优选为97%以上、更进一步优选为98%以上、进而优选为99%以上的同一性。

[0017] 在本发明中,“缺失、取代、添加或插入1个或数个氨基酸的氨基酸序列”是指缺失、取代、添加或插入1个以上20个以下、优选1个以上15个以下、更优选为1个以上10个以下、更优选为1个以上5个以下、更进一步优选为1个以上3个以下的氨基酸的氨基酸序列。另外,“缺失、取代、添加或插入1个或数个核苷酸的核苷酸序列”是指缺失、取代、添加或插入1个以上30个以下、优选为1个以上24个以下、更优选为1个以上15个以下、更进一步优选为1个以上9个以下的核苷酸的核苷酸序列。在本发明中,氨基酸或核苷酸的“添加”中包含在序列的一个末端和两个末端添加氨基酸或核苷酸。

[0018] 这样的缺失、取代、插入、添加等的突变的导入能够通过例如定点突变法等,在对象的碱基序列导入突变来实施。

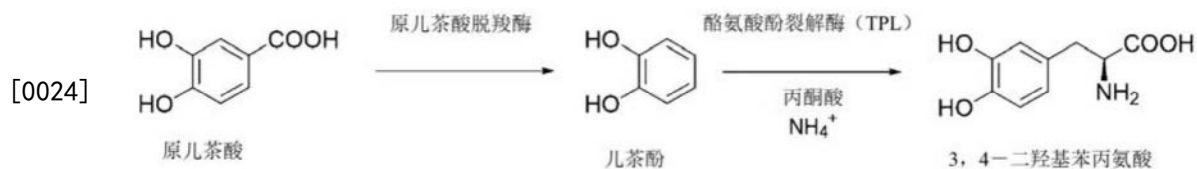
[0019] 在本发明中,关于基因的“上游”和“下游”是指该基因的转录方向的上游和下游。例如,“配置在启动子的下游的基因”是指在DNA正义链中在启动子的3'侧存在该基因的意思,基因的上游是指DNA正义链中的该基因的5'侧的区域。

[0020] 在本发明中,启动子等控制区域与基因的“能够工作地连接”是指基因与控制区域以该基因能够在该控制区域的控制下表达的方式连接。基因与控制区域的“能够工作地连接”的步骤是本领域技术人员公知的。

[0021] 在本发明中,“外来基因”是指从外部导入细胞的外源性的基因。外来基因可以来自与导入有该基因的细胞相同种类的生物,也可以来自不同种类的生物(即异源基因)。

[0022] 在本发明的方法中,3,4-二羟基苯丙氨酸(DOPA)通过使生产原儿茶酸脱羧酶和酪氨酸酚裂解酶的微生物的培养菌体或其破碎物或者该微生物的菌体提取物、与原儿茶酸(PCA)、丙酮酸和铵盐进行接触反应来制造。

[0023] 该反应如下述式所示,是在原儿茶酸通过原儿茶酸脱羧酶转化成儿茶酚后,该儿茶酚与丙酮酸和铵盐通过酪氨酸酚裂解酶(TPL)进行反应,生成3,4-二羟基苯丙氨酸的反应。



[0025] 在本发明中,3,4-二羟基苯丙氨酸包含3,4-二羟基-L-苯丙氨酸(L-DOPA)和3,4-二羟基-D-苯丙氨酸(D-DOPA),优选3,4-二羟基-L-苯丙氨酸(L-DOPA)。

[0026] 在本发明中,DOPA可以是两性离子或盐的形态,作为盐,能够列举例如钠盐、钾盐、钙盐、盐酸盐、硫酸盐等。这些之中,更优选盐酸盐、硫酸盐。

[0027] 本发明的微生物具有原儿茶酸脱羧酶和酪氨酸酚裂解酶的生产能例,具体可以列

举具有编码原儿茶酸脱羧酶和酪氨酸酚裂解酶的基因的微生物。

[0028] 原儿茶酸脱羧酶是指催化将原儿茶酸脱羧生成儿茶酚的反应的酶。作为具有原儿茶酸脱羧酶活性的酶,可以列举:原儿茶酸脱羧酶(Protocatechuate decarboxylase、EC 4.1.1.63)、没食子酸脱羧酶(Gallic acid decarboxylase、EC 4.1.1.59)、4-羟基苯甲酸脱羧酶(4-hydroxybenzoate decarboxylase、EC 4.1.1.61)等,优选原儿茶酸脱羧酶(EC 4.1.1.63)。

[0029] 作为原儿茶酸脱羧酶,可以列举例如以下的(A1)或(A2)的蛋白质。

[0030] (A1)由序列编号18所示的氨基酸序列构成的蛋白质

[0031] (A2)由与序列编号18所示的氨基酸序列具有至少90%以上的同一性的氨基酸序列构成且具有原儿茶酸脱羧酶活性的蛋白质

[0032] 由序列编号18的氨基酸序列构成的蛋白质为来自阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)的原儿茶酸脱羧酶(EcAroY)。

[0033] 在(A2)的蛋白质中,从原儿茶酸脱羧酶活性的观点出发,与序列编号18的氨基酸序列的同一性优选为95%以上,更优选为97%以上,进一步优选为98%以上,更进一步优选为99%以上。

[0034] 在该(A2)的蛋白质的氨基酸序列中,包括例如在序列编号18的氨基酸序列中缺失、取代、插入或添加有1个或数个氨基酸的氨基酸序列。

[0035] 另外,该蛋白质具有原儿茶酸脱羧酶活性例如能够通过将蛋白质与底物(即原儿茶酸)孵育,测定该蛋白质和底物依赖性的儿茶酚的生成来确认。

[0036] 作为原儿茶酸脱羧酶基因,可以列举例如编码上述(A1)或(A2)的蛋白质的基因。

[0037] 具体而言,可以列举以下的(a1)或(a2)的多核苷酸。

[0038] (a1)由序列编号17所示的核苷酸序列构成的多核苷酸

[0039] (a2)由与序列编号17所示的核苷酸序列具有至少90%以上的同一性的核苷酸序列构成且编码具有原儿茶酸脱羧酶活性的多肽的多核苷酸

[0040] 其中,由序列编号17所示的核苷酸序列构成的多核苷酸表示编码来自阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)的原儿茶酸脱羧酶(EcAroY)的基因。

[0041] 在(a2)的核苷酸中,从原儿茶酸脱羧酶活性的观点出发,与序列编号17的核苷酸序列的同一性优选为95%以上,更优选为97%以上,进一步优选为98%以上,更进一步优选为99%以上。

[0042] 在该(a2)的多核苷酸的核苷酸序列中包括例如对序列编号17所示的核苷酸序列缺失、取代、添加或插入有1个或数个核苷酸的核苷酸序列。

[0043] 在本发明中,酪氨酸酚裂解酶(Tyrosine phenol-lyase、EC 4.1.99.2)是指催化将L-酪氨酸分解为苯酚、丙酮酸、氨的反应或其逆反应的酶。另外,酪氨酸酚裂解酶也能够催化将3,4-二羟基苯丙氨酸分解为儿茶酚、丙酮酸、氨的反应或其逆反应。

[0044] 在包含通过酪氨酸酚裂解酶从儿茶酚转化为3,4-二羟基苯丙氨酸的转化反应的反应体系中,据认为酪氨酸酚裂解酶被儿茶酚或作为其前体的原儿茶酸抑制其活性。

[0045] 因此,作为在本发明中使用的酪氨酸酚裂解酶,优选通过原儿茶酸的活性抑制率低的酪氨酸酚裂解酶,可以列举例如在后述的实施例2所示的条件2~6的任何一种条件下,由下述式算出的抑制率为91%以下、优选为90%以下、优选为75%以下、更优选为50%以

下、更优选为40%以下、进一步优选为36%以下的酪氨酸酚裂解酶。

[0046] (数1)

[0047] 酪氨酸酚裂解酶的通过原儿茶酸的抑制率(%) = $100 \times [1 - \text{原儿茶酸存在下从儿茶酚转化为3,4-二羟基苯丙氨酸的转化率(%)}] / (\text{原儿茶酸不存在下从儿茶酚转化为3,4-二羟基苯丙氨酸的转化率(%)})$

[0048] 其中,从儿茶酚转化为3,4-二羟基苯丙氨酸的转化率(%)通过 $100 \times (\text{反应结束时的3,4-二羟基苯丙氨酸的物质量(mol)}) / (\text{反应开始前的儿茶酚的物质量(mol)})$ 算出。

[0049] 作为本发明的酪氨酸酚裂解酶,优选列举例如选自以下的(B1)、(B2)、(C1)、(C2)、(D1)和(D2)中的蛋白质。

[0050] (B1)由序列编号2所示的氨基酸序列构成的蛋白质

[0051] (B2)由与序列编号2所示的氨基酸序列具有至少90%以上的同一性的氨基酸序列构成且具有酪氨酸酚裂解酶活性的蛋白质

[0052] (C1)由序列编号4所示的氨基酸序列构成的蛋白质

[0053] (C2)由与序列编号4所示的氨基酸序列具有至少90%以上的同一性的氨基酸序列构成且具有酪氨酸酚裂解酶活性的蛋白质

[0054] (D1)由序列编号6所示的氨基酸序列构成的蛋白质

[0055] (D2)由与序列编号6所示的氨基酸序列具有至少90%以上的同一性的氨基酸序列构成且具有酪氨酸酚裂解酶活性的蛋白质

[0056] 由序列编号2的氨基酸序列构成的蛋白质为源自具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)的酪氨酸酚裂解酶(FnTPL)。

[0057] 由序列编号4的氨基酸序列构成的蛋白质为源自弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)的酪氨酸酚裂解酶(CfTPL)。

[0058] 由序列编号6的氨基酸序列构成的蛋白质为源自草生欧文氏菌(*Erwinia herbicola*)的酪氨酸酚裂解酶(EwTPL)。

[0059] 在(B2)、(C2)或(D2)的蛋白质中,从酪氨酸酚裂解酶活性的方面出发,各自与序列编号2、序列编号4或序列编号6的氨基酸序列的同一性优选为95%以上,更优选为97%以上,进一步优选为98%以上,更进一步优选为99%以上。

[0060] 该(B2)、(C2)或(D2)的蛋白质的氨基酸序列中包括例如在序列编号2、序列编号4或序列编号6的氨基酸序列中缺失、取代、插入或添加有1个或数个氨基酸的氨基酸序列。

[0061] 另外,该蛋白质具有酪氨酸酚裂解酶活性能够通过例如将蛋白质与底物(即苯酚或儿茶酚、丙酮酸和铵盐)孵育,测定该蛋白质和底物依赖性的酪氨酸或3,4-二羟基苯丙氨酸的生成来确认。

[0062] 作为本发明的酪氨酸酚裂解酶基因,可以列举编码上述(B1)、(B2)、(C1)、(C2)、(D1)和(D2)的各蛋白质的基因。

[0063] 具体而言,可以列举选自以下的(b1)、(b2)、(c1)、(c2)、(d1)和(d2)中的多核苷酸。

[0064] (b1)由序列编号1所示的核苷酸序列构成的多核苷酸

[0065] (b2)由与序列编号1所示的核苷酸序列具有至少90%以上的同一性的核苷酸序列构成且编码具有酪氨酸酚裂解酶活性的多肽的多核苷酸

- [0066] (c1) 由序列编号3所示的核苷酸序列构成的多核苷酸
- [0067] (c2) 由与序列编号3所示的核苷酸序列具有至少90%以上的同一性的核苷酸序列构成且编码具有酪氨酸酚裂解酶活性的多肽的多核苷酸
- [0068] (d1) 由序列编号5所示的核苷酸序列构成的多核苷酸
- [0069] (d2) 由与序列编号5所示的核苷酸序列具有至少90%以上的同一性的核苷酸序列构成且编码具有酪氨酸酚裂解酶活性的多肽的多核苷酸
- [0070] 其中,由序列编号1所示的核苷酸序列构成的多核苷酸表示编码源自具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)的酪氨酸酚裂解酶(FnTPL)的基因。
- [0071] 由序列编号3所示的核苷酸序列构成的多核苷酸表示编码源自弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)的酪氨酸酚裂解酶(CfTPL)的基因。
- [0072] 由序列编号5所示的核苷酸序列构成的多核苷酸表示编码源自草生欧文氏菌(*Erwinia herbicola*)的酪氨酸酚裂解酶(EwTPL)的基因。
- [0073] 在(b2)、(c2)、(d2)的核苷酸中,从酪氨酸酚裂解酶活性的方面出发,与序列编号1、序列编号3和序列编号5的各个核苷酸序列的同一性优选为95%以上,更优选为97%以上,进一步优选为98%以上,更进一步优选为99%以上。
- [0074] 该(b2)、(c2)或(d2)的多核苷酸的核苷酸序列中包括例如对序列编号1、序列编号3或序列编号5所示的核苷酸序列缺失、取代、添加或插入有1个或多个核苷酸的核苷酸序列。
- [0075] 这样的编码酪氨酸酚裂解酶的基因中,从不易受到原儿茶酸对活性的抑制、3,4-二羟基苯丙氨酸的生产效率优异的方面出发,优选源自具核梭杆菌的酪氨酸酚裂解酶(FnTPL)的基因、具体而言编码上述(B1)或(B2)所示的蛋白质的基因、更具体而言由上述(b1)或(b2)所示的核苷酸序列构成的多核苷酸。
- [0076] 本发明的微生物从抑制原儿茶酸造成的对酪氨酸酚裂解酶的活性抑制的方面出发,优选还具有黄素单核苷酸异戊烯基转移酶生产能力,即具有编码黄素单核苷酸异戊烯基转移酶的基因。
- [0077] 黄素单核苷酸异戊烯基转移酶(Flavin prenyltransferase, EC2.5.1.129)是催化从二甲基烯丙基单磷酸(DMAP)将二甲基烯丙基结构与黄素单核苷酸(FMN)的黄素骨架结合,合成异戊二烯化-FMN(prenylated-FMN)的反应的酶。
- [0078] 作为本发明的黄素单核苷酸异戊烯基转移酶,可以列举例如以下的(E1)或(E2)的蛋白质。
- [0079] (E1) 由序列编号24所示的氨基酸序列构成的蛋白质
- [0080] (E2) 由与序列编号24所示的氨基酸序列具有至少90%以上的同一性的氨基酸序列构成且具有黄素单核苷酸异戊烯基转移酶活性的蛋白质
- [0081] 由序列编号24的氨基酸序列构成的蛋白质为源自大肠杆菌的黄素单核苷酸异戊烯基转移酶(EcUbiX)。
- [0082] 在(E2)的蛋白质中,从黄素单核苷酸异戊烯基转移酶活性的方面出发,与序列编号24的氨基酸序列的同一性优选为95%以上,更优选为97%以上,进一步优选为98%以上,更进一步优选为99%以上。
- [0083] 该(E2)的蛋白质的氨基酸序列中包括例如在序列编号24的氨基酸序列缺失、取

代、插入或添加有1个或数个氨基酸的氨基酸序列。

[0084] 另外,该蛋白质具有黄素单核苷酸异戊烯基转移酶活性能够参照例如Nature, 2015, 522:502-506等,能够通过将蛋白质在黄素单核苷酸(FMN)和二甲基烯丙基单磷酸(DMAP)的存在下进行孵育,追踪异戊二烯化-FMN的生成引起的吸收光谱的变化来确认。

[0085] 作为本发明的黄素单核苷酸异戊烯基转移酶基因,可以列举编码上述(E1)或(E2)的蛋白质的基因。

[0086] 具体而言,可以列举下述(e1)或(e2)的多核苷酸。

[0087] (e1)由序列编号23所示的核苷酸序列构成的多核苷酸

[0088] (e2)由与序列编号23所示的核苷酸序列具有至少90%以上的同一性的核苷酸序列构成且编码具有黄素单核苷酸异戊烯基转移酶活性的多肽的多核苷酸

[0089] 其中,由序列编号23所示的核苷酸序列构成的多核苷酸表示编码源自大肠杆菌的黄素单核苷酸异戊烯基转移酶(EcUbiX)的基因。

[0090] 在(e2)的核苷酸中,从黄素单核苷酸异戊烯基转移酶活性的方面出发,与序列编号23的核苷酸序列的同一性优选为95%以上,更优选为97%以上,进一步优选为98%以上,更进一步优选为99%以上。

[0091] 该(e2)的多核苷酸的核苷酸序列包括例如在序列编号23所示的核苷酸序列缺失、取代、添加或插入有1个或数个核苷酸的核苷酸序列。

[0092] 本发明的微生物只要具有上述原儿茶酸脱羧酶和酪氨酸酚裂解酶、根据需要还具有编码黄素单核苷酸异戊烯基转移酶的基因(将这些也称为“本发明的基因”)即可,优选至少1个对于宿主微生物而言为外源性的基因(外来基因)。

[0093] 导入有外来基因的微生物能够通过制备能够使该基因在宿主细胞中表达的表达载体或基因表达盒,将其导入宿主细胞,使宿主细胞转化来制作。

[0094] 作为转化体的宿主的微生物可以为原核生物、真核生物的任意一种,能够使用属于埃希氏菌(*Escherichia*)属的微生物或属于芽孢杆菌(*Bacillus*)属的微生物、放线菌、棒状细菌等的原核生物、或酵母、丝状菌等的真核微生物。其中,优选作为属于埃希氏菌属的微生物的大肠杆菌(*Escherichia coli*)、作为属于欧文氏菌属的微生物的草生欧文氏菌(*Erwinia herbicola*)、作为属于芽孢杆菌属的微生物的枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)、作为属于棒杆菌属的微生物的谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)、作为属于假单胞菌属的微生物的恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、作为属于红球菌属的微生物的约斯特红球菌(*Rhodococcus jostii*),更优选大肠杆菌或谷氨酸棒杆菌。

[0095] 作为成为表达载体的母体的载体,只要能够将本发明的基因导入宿主,能够在宿主细胞内表达该基因的载体即可。优选该载体包含本发明的基因、和与其能够工作地连接的控制区域。该载体可以为质粒等的在染色体外且能够自我增殖和复制的载体,或也可以是整合入染色体内的载体。

[0096] 作为具体的载体,可以列举例如pBluescript II SK(-)(Agilent Technologies公司)、pUC18/19、pUC118/119等的pUC系载体(Takara bio公司)、pET系载体(Merck公司)、pGEX系载体(Merck公司)、pCold系载体(Takara bio公司)、pHY300PLK(Takara bio公司)、pUB110(Mckenzie, T. et al., 1986, Plasmid 15(2):93-103)、pBR322(Takara bio公司)、pMW218/219(Nippon Gene公司)、pRI909/910等的pRI系载体(Takara bio公司)、pBI系载体

(Clontech公司)、IN3系载体(Implanta Innovations公司)、pPTR1/2(Takara bio公司)、pDJB2(D.J.Ballance et al.,Gene,36,321-331,1985)、pAB4-1(van Hartingsveldt W et al.,Mol Gen Genet,206,71-75,1987)、pLeu4(M.I.G.Roncero et al.,Gene,84,335-343,1989)、pPyr225(C.D.Skory et al.,Mol Genet Genomics,268,397-406,2002)、pFG1(Gruber,F.et al.,Curr Genet,18,447-451,1990)等。特别是在宿主为大肠杆菌的情况下,优选使用pET系载体。

[0097] 另外,本发明的基因也可以作为构建为包含该基因的DNA片段。作为该DNA片段,可以列举例如PCR扩增DNA片段和内切酶切断DNA片段。优选该DNA片段可以为包含本发明的基因、以及与其能够工作地连接的控制区域的表达盒。

[0098] 上述载体或DNA片段所含的控制区域是用于使本发明的基因在导入有该载体或DNA片段的宿主细胞内表达的序列,可以列举例如启动子或终止子等的表达调节区域、复制起始点等。该控制区域的种类可以根据要导入载体或DNA片段的宿主微生物的种类适当选择。根据需要,该载体或DNA片段可以还具有抗生物质抗性基因、氨基酸合成相关基因等的选择标记物(例如氨苄西林、新霉素、卡那霉素、氯霉素等的药剂的抗性基因)。

[0099] 本发明的基因与上述控制区域或标记物基因序列的连接能够通过无缝克隆法等方法进行。基因序列向载体的导入程序在该领域中使公知的。启动子区域、终止子、分泌信号区域等的控制区域的种类没有特别限定,可以根据要导入的宿主,适当选择通常使用的启动子或分泌信号序列来使用。

[0100] 作为该控制区域的优选例子,可以例示与野生型相比能够强化表达的强控制区域、例如作为公知的高表达启动子的T7启动子、lac启动子、tac启动子、trp启动子、gap启动子、tuf启动子等,但不特别限定于这些。

[0101] 通过将包含本发明的基因的载体导入宿主,或者将包含本发明的基因的DNA片段导入宿主的基因组,能够得到转化细胞。

[0102] 作为载体或DNA片段向宿主导入的方法,可以使用例如热休克法、电穿孔法、转化法、转染法、接合法、原生质体法、粒子枪法、农杆菌法等。

[0103] 另外,作为将本发明的基因导入宿主的基因组的方法,没有特别限定,可以列举例如使用包含该基因的DNA片段的双交叉法(double-crossover method)。该DNA片段可以在上述宿主细胞中表达量多的基因的启动子序列的下游导入,或者预先制作将该DNA片段与上述控制区域可工作地连接的片段,将该连接片段导入宿主的基因组。此外,该DNA片段也可以预先与用于选择适当导入有本发明的基因的细胞的标记物(药剂抗性基因或营养缺陷型互补基因等)连接。

[0104] 导入有目标载体或DNA片段的转化细胞能够利用选择标记物进行选择。例如,在选择标记物为抗生物质抗性基因的情况下,通过用该抗生物质添加培养基进行培养,能够选择导入有目标载体或DNA片段的转化细胞。另外,例如在选择标记物为氨基酸合成相关基因的情况下,在该氨基酸缺陷性的宿主微生物进行基因导入后,以该氨基酸缺陷性的有无为指标,能够选择导入有目标载体或DNA片段的转化细胞。或者,也能够通过利用PCR等调查转化细胞的DNA序列,来确认目标载体或DNA片段的导入。

[0105] 在本发明的3,4-二羟基苯丙氨酸的制造中,这样得到的微生物的培养菌体或其破碎物或者该微生物的菌体提取物与原儿茶酸、丙酮酸和铵盐被供于接触反应,这里使用的

微生物的培养菌体可以列举培养中以及培养后的微生物培养液、由微生物的培养物分离的菌体、将该培养菌体通过冻结干燥或喷雾干燥形成粉末的粉末菌体、将该培养菌体固定于载体的固定化菌体。作为菌体破碎物,可以列举例如包含本发明的原儿茶酸脱羧酶和酪氨酸酚裂解酶的菌体破碎液或微粒体组分等。另外,作为该微生物的菌体提取物,可以列举将该微生物菌体通过噬菌体、有机溶剂或表面活性剂等药剂、酶、机械力、温度冲击或渗透压冲击等裂解,提取本发明的原儿茶酸脱羧酶和酪氨酸酚裂解酶得到的提取物。

[0106] 微生物的培养能够使用含有碳源、氮源、无机盐类、其它营养物质的培养基(天然培养基、合成培养基)进行。

[0107] 其中,作为碳源,可以列举:葡萄糖、果糖、甘露糖、阿拉伯糖、木糖、半乳糖等的单糖类;纤维二糖、蔗糖(sucrose)、乳糖、麦芽糖、海藻糖、纤维二糖、木二糖等的二糖类;糊精或可溶性淀粉等的多糖类等。另外,在糖类以外,还可以使用甘露醇、山梨醇、木糖醇、甘油这样的糖醇;乙酸、柠檬酸、乳酸、富马酸、马来酸、葡萄糖酸这样的有机酸;乙醇、丙醇这样的醇;正构烷烃这样的烃等。

[0108] 作为氮源,能够使用例如蛋白胨、肉提取物、酵母提取物、酪蛋白水解物、豆粕碱提取物、玉米浆、甲基胺等的烷基胺类、氨基酸等的含氮有机化合物、氨或其盐(氯化铵、硫酸铵、硝酸铵、乙酸铵这样的无机或有机铵化合物)、尿素、氨水、硝酸钠、硝酸钾等。

[0109] 作为无机盐类,可以列举磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、硫酸镁、氯化钠、硝酸亚铁、硫酸锰、硫酸锌、硫酸钴、碳酸钙等。

[0110] 作为其它营养物质,可以列举大豆蛋白水解物、氨基酸类等。

[0111] 此外,培养基中可以添加酪氨酸或酪氨酸替代物、维生素B6类、儿茶酚、3,4-二羟基苯丙氨酸、原儿茶酸、消泡剂等。

[0112] 作为培养条件,培养温度为15°C~45°C是适当的。关于培养pH和培养时间没有特别限定,能够采用例如将pH控制在6.0~8.0并且连续培养6~72小时的方法。另外,在培养中可以根据需要将氨苄西林或卡那霉素等抗生物物质添加到培养基中。

[0113] 上述微生物的培养菌体或其破碎物或者该微生物的菌体提取物与原儿茶酸、丙酮酸和铵盐的接触反应可以将它们混合,通常在20°C~50°C,一边根据需要搅拌或振荡一边进行规定时间(例如30分钟~60小时、优选1小时~24小时)。

[0114] 这里,作为原料使用的原儿茶酸的来源没有特别限定,可以通过有机合成法和使用微生物或酶的方法的任意方法生产得到的,优选使用具有原儿茶酸生产能力的微生物,由作为碳源的葡萄糖等糖类生产得到的。

[0115] 作为铵盐,能够使用乙酸铵、氯化铵、硫酸铵、硝酸铵、磷酸铵、有机酸铵盐等,优选使用硫酸铵。

[0116] 原儿茶酸的浓度优选为0.5~100g/L,更优选为5~15g/L。

[0117] 丙酮酸的浓度优选为0.5~100g/L,更优选为5~15g/L。

[0118] 铵盐的浓度优选为5~150g/L,更优选为50~80g/L。

[0119] 培养菌体或其破碎物或者该微生物的菌体提取物的浓度在2~400g/L的范围是适当的,优选为50~200g/L。

[0120] 通过将原儿茶酸、丙酮酸和铵盐在反应溶液中断续地添加,能够积累3,4-二羟基苯丙氨酸。

[0121] 另外,反应体系中根据需要也可以添加亚硫酸钠、抗坏血酸钠或半胱氨酸等的还原剂、EDTA或柠檬酸等的螯合剂、磷酸吡哆醛等的维生素B6类、Tris/HCl等的缓冲液。

[0122] 还原剂的浓度优选为0.5~20g/L,更优选为2~5g/L。

[0123] 螯合剂的浓度优选为0.5~20g/L,更优选为2~5g/L。

[0124] 磷酸吡哆醛的浓度优选为0.05~5mM,更优选为0.5~2mM。

[0125] 缓冲液的浓度优选为5~200mM,更优选为50~100mM。

[0126] 反应温度优选为5~60°C,更优选为15~30°C。

[0127] 反应pH在5.0~10.0的范围是适当的,优选为6.5~8.5。

[0128] 反应时间可以根据使用的原儿茶酸脱羧酶和酪氨酸酚裂解酶的活性量或底物浓度适当确定,通常为0.5~72小时,优选为6小时~24小时。

[0129] 反应结束后,在反应液中生成的3,4-二羟基苯丙氨酸能够通过将菌体利用离心分离或过滤等分离、回收后,适当组合离子交换树脂处理法、晶析法等通常的方法,来进一步纯化。

[0130] 关于上述实施方式,在本发明中还公开了以下的方式。

[0131] <1>一种3,4-二羟基苯丙氨酸的制造方法,其中,包括:使生产原儿茶酸脱羧酶和酪氨酸酚裂解酶的微生物的培养菌体或其破碎物或者该微生物的菌体提取物与原儿茶酸、丙酮酸和铵盐进行接触反应的工序。

[0132] <2>如<1>所述的方法,其中,微生物具有编码原儿茶酸脱羧酶和酪氨酸酚裂解酶的基因。

[0133] <3>如<2>所述的方法,其中,微生物还具有编码黄素单核苷酸异戊烯基转移酶的基因。

[0134] <4>如<2>或<3>所述的方法,其中,基因中的至少1个为外来基因。

[0135] <5>如<1>~<4>中任一项所述的方法,其中,酪氨酸酚裂解酶是通过原儿茶酸的活性抑制率为91%以下、优选为75%以下、更优选为50%以下、更优选为40%以下、进一步优选为36%以下的酪氨酸酚裂解酶。

[0136] <6>如<1>~<5>中任一项所述的方法,其中,酪氨酸酚裂解酶是选自以下的(B1)、(B2)、(C1)、(C2)、(D1)和(D2)中的蛋白质:

[0137] (B1)由序列编号2所示的氨基酸序列构成的蛋白质;

[0138] (B2)由与序列编号2所示的氨基酸序列具有至少90%以上的同一性的氨基酸序列构成且具有酪氨酸酚裂解酶活性的蛋白质;

[0139] (C1)由序列编号4所示的氨基酸序列构成的蛋白质;

[0140] (C2)由与序列编号4所示的氨基酸序列具有至少90%以上的同一性的氨基酸序列构成且具有酪氨酸酚裂解酶活性的蛋白质;

[0141] (D1)由序列编号6所示的氨基酸序列构成的蛋白质;

[0142] (D2)由与序列编号6所示的氨基酸序列具有至少90%以上的同一性的氨基酸序列构成且具有酪氨酸酚裂解酶活性的蛋白质。

[0143] <7>如<6>所述的方法,其中,酪氨酸酚裂解酶为上述(B1)或(B2)的蛋白质。

[0144] <8>如<1>~<7>中任一项所述的方法,其中,原儿茶酸脱羧酶为以下的(A1)或(A2)的蛋白质:

- [0145] (A1) 由序列编号18所示的氨基酸序列构成的蛋白质；
- [0146] (A2) 由与序列编号18所示的氨基酸序列具有至少90%以上的同一性的氨基酸序列构成且具有原儿茶酸脱羧酶活性的蛋白质。
- [0147] <9> 如<3> ~ <8>中任一项所述的方法,其中,黄素单核苷酸异戊烯基转移酶为以下的(E1)或(E2)的蛋白质:
- [0148] (E1) 由序列编号24所示的氨基酸序列构成的蛋白质;
- [0149] (E2) 由与序列编号24所示的氨基酸序列具有至少90%以上的同一性的氨基酸序列构成且具有黄素单核苷酸异戊烯基转移酶活性的蛋白质。
- [0150] <10> 如<1> ~ <9>中任一项所述的方法,其中,原儿茶酸是以糖类为原料制造得到的。
- [0151] <11> 如<1> ~ <10>中任一项所述的方法,其中,包括从反应溶液中回收3,4-二羟基苯丙氨酸的工序。
- [0152] <12> 一种载体或DNA片段,其中,包含编码原儿茶酸脱羧酶和酪氨酸酚裂解酶的多核苷酸。
- [0153] <13> 如<12>所述的载体或DNA片段,其中,还包含编码黄素单核苷酸异戊烯基转移酶的多核苷酸。
- [0154] <14> 如<12>或<13>所述的载体或DNA片段,其中,酪氨酸酚裂解酶为选自以下的(B1)、(B2)、(C1)、(C2)、(D1)和(D2)中的蛋白质:
- [0155] (B1) 由序列编号2所示的氨基酸序列构成的蛋白质;
- [0156] (B2) 由与序列编号2所示的氨基酸序列具有至少90%以上的同一性的氨基酸序列构成且具有酪氨酸酚裂解酶活性的蛋白质;
- [0157] (C1) 由序列编号4所示的氨基酸序列构成的蛋白质;
- [0158] (C2) 由与序列编号4所示的氨基酸序列具有至少90%以上的同一性的氨基酸序列构成且具有酪氨酸酚裂解酶活性的蛋白质;
- [0159] (D1) 由序列编号6所示的氨基酸序列构成的蛋白质;
- [0160] (D2) 由与序列编号6所示的氨基酸序列具有至少90%以上的同一性的氨基酸序列构成且具有酪氨酸酚裂解酶活性的蛋白质。
- [0161] <15> 如<12> ~ <14>中任一项所述的载体或DNA片段,其中,原儿茶酸脱羧酶为以下的(A1)或(A2)的蛋白质:
- [0162] (A1) 由序列编号18所示的氨基酸序列构成的蛋白质;
- [0163] (A2) 由与序列编号18所示的氨基酸序列具有至少90%以上的同一性的氨基酸序列构成且具有原儿茶酸脱羧酶活性的蛋白质。
- [0164] <16> 如<13> ~ <15>中任一项所述的载体或DNA片段,其中,黄素单核苷酸异戊烯基转移酶为以下的(E1)或(E2)的蛋白质:
- [0165] (E1) 由序列编号24所示的氨基酸序列构成的蛋白质;
- [0166] (E2) 由与序列编号24所示的氨基酸序列具有至少90%以上的同一性的氨基酸序列构成且具有黄素单核苷酸异戊烯基转移酶活性的蛋白质。
- [0167] <17> 一种转化细胞,其中,含有<12> ~ <16>中任一项所述的载体或DNA片段。

[0168] <18> 如<1> ~ <11> 中任一项所述的方法,其中,微生物为<17>的转化细胞。

[0169] 实施例

[0170] 实施例1包含各种基因的质粒的制作

[0171] 在以下的实施例中,PCR使用KOD One PCR Master Mix(东洋纺公司)进行。

[0172] (1) 包含编码酪氨酸酚裂解酶的基因的质粒(pET__FnTPL、pET__CfTPL、pET__EwTPL)的制作

[0173] 通过人工基因合成(Eurofins Genomics公司)制作编码源自具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)的酪氨酸酚裂解酶(FnTPL)的基因的DNA片段(序列编号1)、编码源自弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)的酪氨酸酚裂解酶(CfTPL)的基因的DNA片段(序列编号3)、以及编码源自草生欧文氏菌(*Erwinia herbicola*)的酪氨酸酚裂解酶(EwTPL)的基因的DNA片段(序列编号5),将其作为模板,通过使用表1所示的各引物的PCR得到插入物用DNA片段。接着使用引物pET vec F(序列编号13、CACCACCACCACCACCTGAG)以及pET vec R(序列编号14、ATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTCTAGAGG),以pET21a质粒为模板,通过PCR得到载体用DNA片段。对于这些PCR产物,进行利用DpnI(Takara bio公司)的处理后,通过NucleoSpin Gel and PCR clean-up(Takara bio公司)纯化各DNA片段。将纯化后的DNA片段通过In-Fusion HD Cloning Kit(Takara bio公司)连接,由此构建各质粒(pET__FnTPL、pET__CfTPL、pET__EwTPL)。使用所得到的质粒溶液,转化到ECOS感受态*E. coli* DH5 α (ECOS competent *E. coli* DH5 α , Nippon Gene公司)中,将细胞液涂布到LBamp琼脂培养基(细菌用胰蛋白胨(Bacto Tryptone)1%、酵母提取物(Yeast Extract)0.5%、NaCl 1%、氨苄西林钠50 μ g/mL、琼脂1.5%)后在37 $^{\circ}$ C静置过夜,对所得到的菌落进行使用引物pET CPR1 F(序列编号15、CGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTG)以及pET CPR1R(序列编号16、CCAAGGGTTATGCTAGTTATTGCTCAG)的PCR反应,选择确认导入有目标DNA片段的转化株。将所得到的转化株接种到LBamp液体培养基(细菌用胰蛋白胨(Bacto Tryptone)1%、酵母提取物(Yeast Extract)0.5%、NaCl 1%、氨苄西林钠50 μ g/mL)2mL后在37 $^{\circ}$ C培养过夜。从该培养液利用NucleoSpin Plasmid EasyPure(Takara bio公司)纯化出质粒。

[0174] [表1]

引物	序列(5' \rightarrow 3')	序列编号
FnTPL ins F	GAAGGAGATATACATATGAGGTTTCGAGGACTATCCAGC	7
FnTPL ins R	GTGGTGGTGGTGGTGTACTTCTTAATCCCAAAGC	8
CfTPL ins F	GAAGGAGATATACATATGAATTATCCGGCAGAACC	9
CfTPL ins R	GTGGTGGTGGTGGTGTAAATGTAGTCGAACCTCGC	10
EwTPL ins F	GAAGGAGATATACATATGAATTATCCGGCAGAG	11
EwTPL ins R	GTGGTGGTGGTGGTGTAAATGAAATCAAACCTTG	12

[0176] (2) 包含编码酪氨酸酚裂解酶、原儿茶酸脱羧酶和黄素单核苷酸异戊烯基转移酶的基因的质粒的制作 (a) 包含编码原儿茶酸脱羧酶的基因的质粒(pET__EcAroY)的制作

[0177] 通过人工基因合成(Eurofins Genomics公司)制作编码源自阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)的原儿茶酸脱羧酶(EcAroY)的基因的DNA片段(序列编号17)。将其作为模板,通过使用引物EcaroY ins F(序列编号19、GAAGGAGATATACATATGCAAACCCGAT

AAATGAC) 以及EcaroY ins R(序列编号20、GTGGTGGTGGTGGTGTATTCTTATCGCTAAATAACTC)的PCR得到插入物用DNA片段。接着,使用引物pET vec F(序列编号13)以及pET vec R(序列编号14)以pET21a质粒为模板,通过PCR,得到载体用DNA片段。对这些PCR产物进行通过DpnI(Takara bio公司)的处理后,通过NucleoSpin Gel and PCR clean-up(Takara bio公司)纯化各DNA片段。将纯化后的DNA片段通过In-Fusion HD Cloning Kit(Takara bio公司)连接,由此构建质粒(pET__EcAroY)。使用所得到的质粒溶液转化到ECOS competent E.coli DH5 α (Nippon Gene公司),将细胞液涂布到LBamp琼脂培养基后在37 $^{\circ}$ C静置过夜,对所得到的菌落进行使用引物pET CPCR2 F(序列编号21、AGATCTCGATCCCGCGAAAT)和pET CPCR2 R(序列编号22、TTTAGAGGCCCAAGGGTT)的PCR反应,选择确认导入有目标DNA片段的转化株。将所得到的转化株接种到LBamp液体培养基2mL后在37 $^{\circ}$ C培养过夜。从该培养液利用NucleoSpin Plasmid EasyPure(Takara bio公司)纯化出质粒。

[0178] (b) 包含编码原儿茶酸脱羧酶和黄素单核苷酸异戊烯基转移酶的基因的质粒(pET__EcAroY-EcUbiX)的制作

[0179] 通过人工基因合成(Eurofins Genomics公司)制作编码源自大肠杆菌的黄素单核苷酸异戊烯基转移酶(EcUbiX)的基因的DNA片段(序列编号23)。以其为模板使用引物EcUbiX ins F(序列编号25、AAGGAGGTTTGATTCATGAAACGGCTTATTGTGGCATT)和EcUbiX ins R(序列编号26、GTGGTGGTGGTGGTGGTGTAAAGCACCTGCCACCGGCA),通过PCR得到插入物用DNA片段。对(a)中制作得到的质粒(pET__EcAroY),通过使用引物EcAroY vec R(序列编号27、GAATCAAACCTCCTTTATTCTTATCGCTAAATAACTCTG)和EcAroY vec F(序列编号28、CACCACCAC CACCCTGAGATCCGGCTGCTAACAAGCCC)的PCR得到载体用DNA片段。对这些PCR产物,进行通过DpnI(Takara bio公司)的处理后,利用NucleoSpin Gel and PCR clean-up(Takara bio公司)纯化各DNA片段。将纯化后的DNA片段通过In-Fusion HD Cloning Kit(Takara bio公司)连接,由此构建目标质粒(pET__EcAroY-EcUbiX)。使用所得到的质粒溶液转化ECOS competent E.coli DH5 α (Nippon Gene公司),将细胞液涂布到LBamp琼脂培养基后在37 $^{\circ}$ C静置过夜,对所得到的菌落进行使用引物pET CPCR2 F(序列编号21)和pET CPCR2 R(序列编号22)的PCR反应,选择确认导入有目标DNA片段的转化株。将所得到的转化株接种于LBamp液体培养基2mL后在37 $^{\circ}$ C培养过夜。从该培养液利用NucleoSpin Plasmid EasyPure(Takara bio公司)纯化出质粒。

[0180] (c) 包含编码酪氨酸酚裂解酶、原儿茶酸脱羧酶和黄素单核苷酸异戊烯基转移酶的基因的质粒的制作

[0181] 以(1)中制作的各质粒(pET__FnTPL、pET__CfTPL、pET__EwTPL)为模板,使用表2所示的各引物,通过PCR得到插入物用DNA片段。接着,以(b)中制作的质粒(pET__EcAroY-EcUbiX)为模板使用引物EcAroY-EcUbiX vec F(序列编号35、AGGAGGTTTGATTCATGCAAAACCGATAAATGAC)和EcAroY-EcUbiX vec R(序列编号36、ATGTATATCTCCTTCTAAAGTTAA),通过PCR得到载体用DNA片段。对这些PCR产物进行通过DpnI(Takara bio公司)的处理后,利用NucleoSpin Gel and PCR clean-up(Takara bio公司)纯化各DNA片段。将纯化后的DNA片段通过In-Fusion HD Cloning Kit(Takara bio公司)连接,由此构建目标质粒(pET__FnTPL-EcAroY-EcUbiX、pET__CfTPL-EcAroY-EcUbiX、pET__EwTPL-EcAroY-EcUbiX)。使用所得到的质粒溶液转化ECOS competent E.coli DH5 α (Nippon Gene公司),将细胞液涂布到

LBamp琼脂培养基后在37°C静置过夜,对所得到的菌落进行使用引物pET_CPCR2_F(序列编号20)和pET_CPCR2_R(序列编号21)的PCR反应,选择确认导入有目标DNA片段的转化株。将所得到的转化株接种于LBamp液体培养基2mL后在37°C培养过夜。从该培养液利用NucleoSpin Plasmid EasyPure(Takara bio公司)纯化出质粒。

[0182] [表2]

引物	序列(5' → 3')	序列编号
FnTPL2 insF	GAAGGAGATATACATATGAGGTTTCGAGGACTATCC	29
FnTPL2 insR	TGAATCAAACCTCCTTTACTTCTTAATCCCAAAGC	30
CfTPL2 insF	GAAGGAGATATACATATGAATTATCCGGCAGAACC	31
CfTPL2 insR	TGAATCAAACCTCCTTTAAATGTAGTCGAACCTCG	32
EwTPL2 insF	GAAGGAGATATACATATGAATTATCCGGCAGAGCC	33
EwTPL2 insR	TGAATCAAACCTCCTTTAAATGAAATCAAACCTTG	34

[0184] 实施例2原儿茶酸对酪氨酸酚裂解酶的抑制率评价

[0185] (1) 质粒向宿主细胞的导入

[0186] 使用实施例1(1)中得到的各质粒(pET_FnTPL、pET_CfTPL、pET_EwTPL),通过热休克法转化到ECOS competent E.coli BL21(DE3)(Nippon Gene公司)中。将所得到的转化细胞液涂布到LBamp琼脂培养基后以37°C静置16小时,将所得到的菌落作为转化体。

[0187] (2) 转化株的培养

[0188] 将(1)中得到的转化体接种到含有表3所示的培养基(包含氨苄西林钠50μg/mL)10mL的大型试管中,在37°C培养过夜,使目标蛋白质表达。将培养液离心分离(3,000rpm,10分钟),由此去除培养上清,得到含有目标蛋白质的菌体。将各质粒(pET_FnTPL、pET_CfTPL、pET_EwTPL)转化后培养得到的菌体分别称为菌体1、菌体2和菌体3。将菌体1~3的宿主和所表达的酶记载于表4。

[0189] [表3]

培养基组成(每1L)	
蛋白胨	15g
酵母提取物	12g
NaCl	10g
甘油	15mL
(NH ₄) ₂ SO ₄	5g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.375g
KH ₂ PO ₄	1.36g
K ₂ HPO ₄	2.28g
乳糖	15g
盐酸吡哆醇	0.1g

[0191] [表4]

菌体	宿主	所表达的酶
菌体1	E.coli BL21(DE3)	FnTPL

菌株2	E.coli BL21 (DE3)	CfTPL
菌株3	E.coli BL21 (DE3)	EwTPL

[0193] FnTPL (酪氨酸酚裂解酶) : 序列编号2

[0194] CfTPL (酪氨酸酚裂解酶) : 序列编号4

[0195] EwTPL (酪氨酸酚裂解酶) : 序列编号6

[0196] (3) 使用菌株1~3的通过原儿茶酸对酪氨酸酚裂解酶的抑制率的测定

[0197] 使用(2)中得到的菌株1、菌株2和菌株3, 从在原儿茶酸的存在下以儿茶酚为底物的向3,4-二羟基苯丙氨酸的转化率, 求出原儿茶酸对各种酪氨酸酚裂解酶的抑制率。在包含各种浓度的原儿茶酸的表5的条件1~6所记载的反应溶液(总量200 μ L)中, 使用终浓度100g/L的菌株在30 $^{\circ}$ C进行4小时从儿茶酚向3,4-二羟基苯丙氨酸的转化反应。将所得到的反应溶液中的3,4-二羟基苯丙氨酸浓度根据参考例1的方法进行定量, 按照下述式算出从儿茶酚向3,4-二羟基苯丙氨酸的转化率。

[0198] (数2)

[0199] 从儿茶酚向3,4-二羟基苯丙氨酸的转化率(%) = $100 \times \{ \text{反应结束时的3,4-二羟基苯丙氨酸的物质质量 (mol)} / \{ \text{反应开始前的儿茶酚的物质质量 (mol)} \}$

[0200] 另外, 酪氨酸酚裂解酶的通过原儿茶酸的抑制率按照下述式计算。

[0201] (数3)

[0202] 酪氨酸酚裂解酶的通过原儿茶酸的抑制率(%) = $100 \times [1 - \{ \text{原儿茶酸存在下从儿茶酚向3,4-二羟基苯丙氨酸的转化率(\%)} / \{ \text{原儿茶酸不存在下从儿茶酚向3,4-二羟基苯丙氨酸的转化率(\%)} \}]$

[0203] [表5]

[0204]

	条件1	条件2	条件3	条件4	条件5	条件6
原儿茶酸 (g/L)	0	2	4	6	8	10
儿茶酚 (g/L)	5	5	5	5	5	5
丙酮酸钠 (g/L)	10	10	10	10	10	10
硫酸铵 (g/L)	66	66	66	66	66	66
抗坏血酸钠 (g/L)	4	4	4	4	4	4
磷酸吡哆醛 (mM)	1	1	1	1	1	1
乙二胺四乙酸二钠 (g/L)	2	2	2	2	2	2
Tris/HCl (pH7.5) (mM)	100	100	100	100	100	100

[0205] 比较FnTPL、CfTPL和EwTPL的通过原儿茶酸的抑制率(表6)。

[0206] 如表6所示, 在任何TPL下, 抑制率的值都依赖于原儿茶酸的浓度而上升。在条件2~6的任意条件下, FnTPL的通过原儿茶酸的抑制率都为最低值。

[0207] [表6]

[0208] 各酪氨酸酚裂解酶的通过原儿茶酸的抑制率(%)

[0209]

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

[0210] 实施例3使用菌体催化剂的以原儿茶酸为底物的3,4-二羟基苯丙氨酸的生产

[0211] (1) 质粒向宿主细胞的导入

[0212] 使用实施例1(2)中得到的各质粒(pET__FnTPL-EcAroY-EcUbiX、pET__CfTPL-EcAroY-EcUbiX、pET__EwTPL-EcAroY-EcUbiX),通过热休克法转化到ECOS competent E.coli BL21(DE3) (Nippon Gene公司)中。将所得到的转化细胞液涂布到LBamp琼脂培养基后在37°C静置16小时,将所得到的菌落作为转化体。

[0213] (2) 转化株的培养

[0214] 将(1)中得到的转化体接种于含有表3所示的培养基(包含氨苄西林钠50μg/mL)10mL的大型试管中,在37°C培养过夜,使目标蛋白质表达。将培养液进行离心分离(3,000rpm,10分钟),由此去除培养上清,得到含有目标蛋白质的菌体。将各质粒(pET__FnTPL-EcAroY-EcUbiX、pET__CfTPL-EcAroY-EcUbiX、和pET__EwTPL-EcAroY-EcUbiX)转化后培养得到的菌体分别称为菌体4、菌体5、和菌体6。将菌体4~6的宿主和所表达的酶记载于表7。

[0215] [表7]

菌体	宿主	所表达的酶
菌体4	E.coli BL21(DE3)	FnTPL, EcAroY, EcUbiX
菌体5	E.coli BL21(DE3)	CfTPL, EcAroY, EcUbiX
菌体6	E.coli BL21(DE3)	EwTPL, EcAroY, EcUbiX

[0217] FnTPL(酪氨酸酚裂解酶):序列编号2

[0218] CfTPL(酪氨酸酚裂解酶):序列编号4

[0219] EwTPL(酪氨酸酚裂解酶):序列编号6

[0220] EcAroY(原儿茶酸脱羧酶):序列编号18

[0221] EcUbiX(黄素单核苷酸异戊烯基转移酶):序列编号24

[0222] (3) 使用菌体4~6的以原儿茶酸为底物的3,4-二羟基苯丙氨酸的生产能力的测定

[0223] 评价使用(2)中得到的菌体4、菌体5和菌体6以原儿茶酸为底物的3,4-二羟基苯丙氨酸的生产能力。在包含各种浓度的原儿茶酸和丙酮酸的表8的条件7~11所记载的反应溶液(总量200μL)中,使用终浓度100g/L的菌体在30°C进行4小时从原儿茶酸向3,4-二羟基苯丙氨酸的转化反应。按照参考例1的方法对所得到的反应溶液中的3,4-二羟基苯丙氨酸浓度进行定量,按照下述式,计算以原儿茶酸为底物的3,4-二羟基苯丙氨酸的生产能力。

[0224] (数4)

[0225] 以原儿茶酸为底物的3,4-二羟基苯丙氨酸的生产能力(%) = 100 × (反应结束时的3,4-二羟基苯丙氨酸的物质量(mol)) / (反应开始前的原儿茶酸的物质量(mol))

[0226] [表8]

	条件7	条件8	条件9	条件10	条件11
原儿茶酸(g/L)	2	4	6	8	10
丙酮酸钠(g/L)	1.4	2.9	4.3	5.7	7.1
硫酸铵(g/L)	66	66	66	66	66
抗坏血酸钠(g/L)	4	4	4	4	4
磷酸吡哆醛(mM)	1	1	1	1	1
乙二胺四乙酸二钠(g/L)	2	2	2	2	2

Tris/HCl (pH7.5) (mM)	100	100	100	100	100
-----------------------	-----	-----	-----	-----	-----

[0228] 评价了使用菌体4、5、6的从原儿茶酸的3,4-二羟基苯丙氨酸的生产能力(表9)。

[0229] 如表9所示,在条件7~11下,3,4-二羟基苯丙氨酸的生产能力在使用表达FnTPL的菌体4的情况下为60~80%,在使用表达CfTPL的菌体5的情况下为44~57%,在使用表达EwTPL的菌体6的情况下为24~38%。从原儿茶酸的3,4-二羟基苯丙氨酸的生产能力在任何条件下,都是在使用表达不易受到原儿茶酸的活性抑制的FnTPL的菌体4的情况显示最高的值。

[0230] [表9]

[0231] 以原儿茶酸为底物的3,4-二羟基苯丙氨酸的生产能力(%)

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

[0233] 参考例1 3,4-二羟基苯丙氨酸的定量

[0234] 3,4-二羟基苯丙氨酸的定量通过HPLC进行。将供于HPLC分析的反应液用0.1%磷酸适当稀释后,使用AcroPrep 96过滤板(0.2 μ mGHP膜、日本Pall公司)进行不溶物的除去。HPLC的装置使用Chromaster(Hitachi High-Tech公司)。分析柱使用L-柱ODS(4.6mm I.D.×150mm、化学物质评价研究机构),洗脱液A为0.1M磷酸二氢钾的0.1%磷酸溶液,洗脱液B为70%甲醇,在流速1.0mL/分钟、柱温40°C的条件下进行梯度洗脱。3,4-二羟基苯丙氨酸的检测使用UV检测器(检测波长280nm)。使用标准试样(3,4-二羟基-L-苯丙氨酸(商家编码A11311、富士胶片和光纯药株式会社))制作浓度标准曲线,根据浓度标准曲线进行3,4-二羟基苯丙氨酸的定量。