

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7228914号  
(P7228914)

(45)発行日 令和5年2月27日(2023. 2. 27)

(24)登録日 令和5年2月16日(2023. 2. 16)

(51)Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/63 (2006. 01)	C 1 2 N 15/63 Z
C 1 2 P 13/00 (2006. 01)	C 1 2 P 13/00
C 1 2 N 15/52 (2006. 01)	C 1 2 N 15/52 Z Z N A
C 1 2 N 1/21 (2006. 01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N 1/20 (2006. 01)	C 1 2 N 1/20 A

請求項の数 17 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2020-503673(P2020-503673)	(73)特許権者	503360115
(86)(22)出願日	平成31年3月4日(2019. 3. 4)		国立研究開発法人科学技術振興機構
(86)国際出願番号	PCT/JP2019/008482		埼玉県川口市本町四丁目1番8号
(87)国際公開番号	W02019/168203	(74)代理人	100099759
(87)国際公開日	令和1年9月6日(2019. 9. 6)		弁理士 青木 篤
審査請求日	令和4年1月6日(2022. 1. 6)	(74)代理人	100123582
(31)優先権主張番号	特願2018-37794(P2018-37794)		弁理士 三橋 真二
(32)優先日	平成30年3月2日(2018. 3. 2)	(74)代理人	100141977
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		弁理士 中島 勝
		(74)代理人	100117019
			弁理士 渡辺 陽一
		(74)代理人	100123593
			弁理士 関根 宣夫

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 4-アミノ桂皮酸を製造する方法、並びに、それに用いられるベクター及び宿主細胞

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

4-ニトロフェニルアラニンから4-アミノ桂皮酸を製造する方法であって、

(1) 4-ニトロフェニルアラニンを4-ニトロ桂皮酸に変換し、

(2) 4-ニトロ桂皮酸を4-アミノ桂皮酸に変換する

ことを含み、

前記(1)の変換が、配列番号1、3、又は5で表されるアミノ酸配列に対して90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ、4-ニトロフェニルアラニンを4-ニトロ桂皮酸に変換する活性を有する第1の酵素を産出する生物もしくは当該生物から抽出された前記酵素を用いた酵素反応により行われ、

前記(2)の変換が、配列番号7、9、11、13又は15で表されるアミノ酸配列に対して90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ、4-ニトロ桂皮酸を4-アミノ桂皮酸に変換する活性を有する第2の酵素を産出する生物もしくは当該生物から抽出された前記酵素を用いた酵素反応により行われ、

前記(1)の変換にかかる酵素反応が、pH7.5以上、27℃以上で行われ、

前記(2)の変換にかかる酵素反応が、pH6.5以上、27℃以上で行われる、方法。

【請求項2】

前記第1の酵素が有するアミノ酸配列が、配列番号1、3、又は5で表されるアミノ酸配列、もしくは、当該配列において1個又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されてなるアミノ酸配列であり、

前記第 2 の酵素が有するアミノ酸配列が、配列番号 7、9、11、13 又は 15 で表されるアミノ酸配列、もしくは、当該配列において 1 個又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されてなるアミノ酸配列である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記の欠失、置換又は付加されてなるアミノ酸の数が 1 ~ 5 個である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記(1)の変換が、前記第 1 の酵素を産出する生物を用いて行われる、請求項 1 ~ 3 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記第 1 の酵素を産出する生物が、前記第 1 の酵素を発現するよう改変された宿主細胞である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記第 1 の宿主細胞が微生物である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記微生物が細菌である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記(1)の変換が、前記第 1 の宿主細胞である細菌の休止菌体を用いた休止菌体反応により行われる、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記(2)の変換が、前記第 2 の酵素を産出する生物を用いて行われる、請求項 1 ~ 8 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記第 2 の酵素を産出する生物が、前記第 2 の酵素を発現するよう改変された宿主細胞である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記第 2 の宿主細胞が微生物である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記微生物が細菌である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記(2)の変換が、前記第 2 の宿主細胞である細菌の休止菌体を用いた休止菌体反応により行われる、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記休止菌体が培養菌体、粉末菌体、及び固定化菌体からなる群から選択される、請求項 8 又は 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記(2)の変換が pH 8 ~ 9 で行われる、請求項 1 ~ 14 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 16】

グルコースから 4 - アミノ桂皮酸を製造する方法であって、

(a) グルコースからフェニルアラニンを産生し、  
 (b) 前記(a)で得られたフェニルアラニンをニトロ化して 4 - ニトロフェニルアラニンに変換し、  
 (c) 請求項 1 ~ 15 の何れか一項に記載の方法により、前記(b)で得られた 4 - ニトロフェニルアラニンから 4 - アミノ桂皮酸を製造することを含む方法。

【請求項 17】

フェニルアラニンから 4 - アミノ桂皮酸を製造する方法であって、

(b) フェニルアラニンをニトロ化して 4 - ニトロフェニルアラニンに変換し、  
 (c) 請求項 1 ~ 15 の何れか一項に記載の方法により、前記(b)で得られた 4 - ニト

10

20

30

40

50

ロフェニルアラニンから 4 - アミノ桂皮酸を製造することを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、バイオマス由来の芳香族ポリマーの原料モノマーとして有用な 4 - アミノ桂皮酸を製造するための新規な方法、並びに、斯かる方法に用いられる新規なベクター及び宿主細胞に関する。

【背景技術】

【0002】

石油資源の枯渇に対する懸念や二酸化炭素排出問題により、再生可能な資源であるバイオマスを利用して燃料・化成品等を生産するシステムの重要性が高まっている。バイオマス由来のポリマーとしては、脂肪族系ポリマーと芳香族ポリマーとが挙げられるが、現在のところ研究・開発が進んでいるのは、主にポリ乳酸を始めとする脂肪族系ポリマーである。ポリ乳酸は耐熱性・耐久性が低いという課題があったが、結晶化度の向上等によりこれらの課題は改善されつつある。一方、芳香族ポリマーは熱安定性や力学強度等の点で優れた物質特性を示すことが多く、エンジニアリングプラスチックの原料等としての利用が期待される。

【0003】

バイオマス由来の芳香族ポリマーの原料モノマーとして特に注目されるのは、4 - アミノ桂皮酸である。例えば特許文献 1 及び非特許文献 1 には、4 - アミノ桂皮酸を原料として高耐熱性の優れた芳香族ポリマーを合成する方法が報告されている。よって、斯かる高耐熱ポリマーの原料のモノマーとして、バイオマスから 4 - アミノ桂皮酸を高効率で合成することが求められている。

【0004】

本発明者等は、バイオマスのグルコースから 4 - アミノ桂皮酸を合成する方法として、微生物由来の酵素を用い、まずグルコースからコリスミ酸及び 4 - アミノフェニルピルビン酸を経て 4 - アミノフェニルアラニンを合成し（特許文献 2）、次いでこの 4 - アミノフェニルアラニンを 4 - アミノ桂皮酸に変換する（特許文献 3）という経路を開発している。

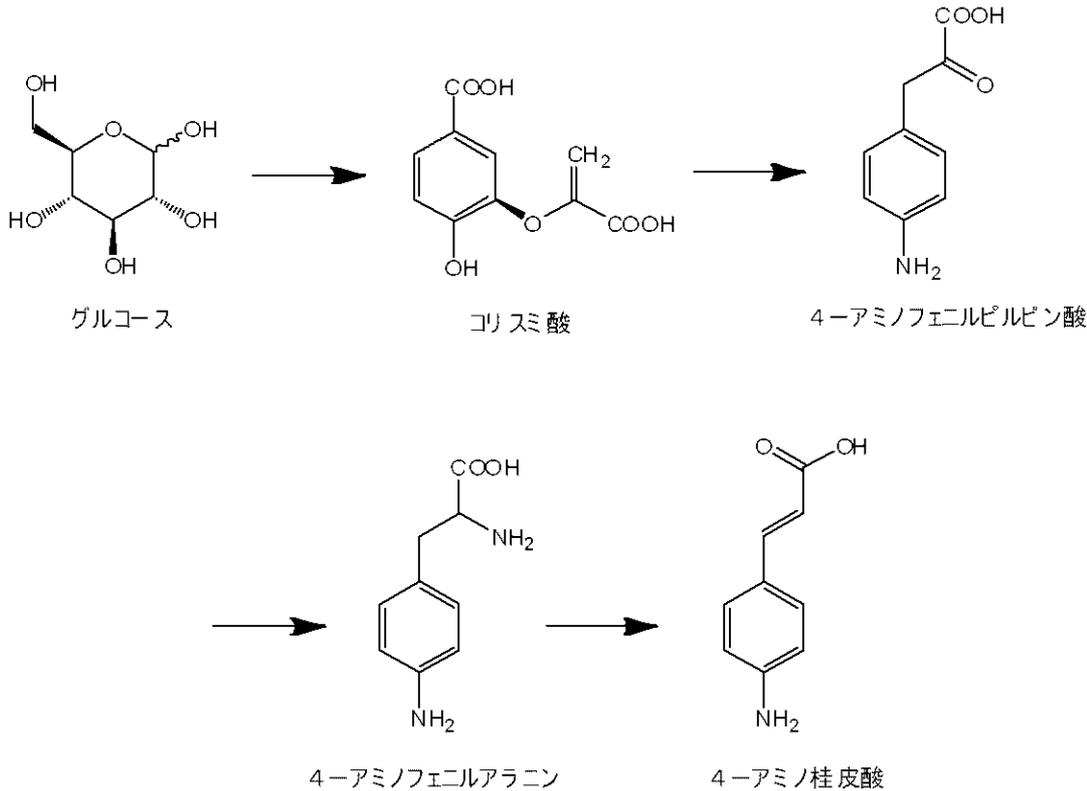
【0005】

10

20

30

## 【化 1】



## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0006】

【特許文献1】国際公開第2013/073519号

【特許文献2】国際公開第2015/141791号

【特許文献3】国際公開第2015/119251号

## 【非特許文献】

## 【0007】

【非特許文献1】Suvannasara et al., *Macromolecules*, (2014), 47[5]1586-1593

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0008】

本発明者等による前述の4-アミノ桂皮酸の合成法は、優れた方法ではあるものの、反応速度や反応効率等の点でまだ改善の余地があった。

## 【0009】

本発明の目的は、4-アミノ桂皮酸を合成する新規な方法の提供にある。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0010】

本発明者等は鋭意検討の結果、グルコースからの合成経路が知られている4-ニトロフェニルアラニンを用いて、これをまず4-ニトロ桂皮酸に変換し、次いで4-ニトロ桂皮酸を4-アミノ桂皮酸に変換することにより、グルコースから4-アミノ桂皮酸を合成する新規な経路を確立することに想到した。更に、4-ニトロフェニルアラニンから4-ニトロ桂皮酸への変換、及び、4-ニトロ桂皮酸から4-アミノ桂皮酸への変換の双方を、生物由来の適切な酵素を用いて実現できることを見出し、本発明を完成させた。

## 【0011】

即ち、本発明の要旨は以下に存する。

[1] 4-ニトロフェニルアラニンから4-アミノ桂皮酸を製造する方法であって、

(1) 4-ニトロフェニルアラニンを4-ニトロ桂皮酸に変換し、

(2) 4 - ニトロ桂皮酸を4 - アミノ桂皮酸に変換することを含む方法。

[2] 前記(1)の変換が、配列番号1、3、又は5で表されるアミノ酸配列に対して80%以上の配列相同性を有するアミノ酸配列からなり、且つ、4 - ニトロフェニルアラニンを4 - ニトロ桂皮酸に変換する活性を有する第1の酵素を用いて行われる、[1]の方法。

[3] 前記(1)の変換が、前記第1の酵素を発現するよう改変された第1の宿主細胞を用いて行われる、[2]の方法。

[4] 前記第1の宿主細胞が微生物である、[3]の方法。

[5] 前記微生物が細菌である、[4]の方法。

[6] 前記(1)の変換が、前記第1の宿主細胞である細菌の休止菌体を用いた休止菌体反応により行われる、[5]の方法。

[7] 前記(2)の変換が、配列番号7、9、11、13又は15で表されるアミノ酸配列に対して80%以上の配列相同性を有するアミノ酸配列からなり、且つ、4 - ニトロ桂皮酸を4 - アミノ桂皮酸に変換する活性を有する第2の酵素を用いて行われる、[1] ~ [6]の方法。

[8] 前記(2)の変換が、前記第2の酵素を発現する第2の宿主細胞を用いて行われる、[7]の方法。

[9] 前記第2の宿主細胞が、前記第2の酵素を発現するよう改変された宿主細胞である、[8]に記載の方法。

[10] 前記第2の宿主細胞が微生物である、[8]又は[9]の方法。

[11] 前記微生物が細菌である、[10]の方法。

[12] 前記(2)の変換が、前記第2の宿主細胞である細菌の休止菌体を用いた休止菌体反応により行われる、[11]の方法。

[13] 前記休止菌体が培養菌体、粉末菌体、及び固定化菌体からなる群から選択される、[6]又は[12]の方法。

[14] 前記(2)の変換がpH8 ~ 9で行われる、[7] ~ [13]の方法。

[15] グルコースから4 - アミノ桂皮酸を製造する方法であって、

(a) グルコースからフェニルアラニンを産生し、

(b) 前記(a)で得られたフェニルアラニンをニトロ化して4 - ニトロフェニルアラニンに変換し、

(c) [1] ~ [14]の方法により、前記(b)で得られた4 - ニトロフェニルアラニンから4 - アミノ桂皮酸を製造する

ことを含む方法。

[16] フェニルアラニンから4 - アミノ桂皮酸を製造する方法であって、

(b) フェニルアラニンをニトロ化して4 - ニトロフェニルアラニンに変換し、

(c) [1] ~ [14]の方法により、前記(b)で得られた4 - ニトロフェニルアラニンから4 - アミノ桂皮酸を製造する

ことを含む方法。

[17] 4 - ニトロフェニルアラニンから4 - ニトロ桂皮酸を製造する方法であって、配列番号1、3、又は5で表されるアミノ酸配列に対して80%以上の配列相同性を有するアミノ酸配列からなり、且つ、4 - ニトロフェニルアラニンを4 - ニトロ桂皮酸に変換する活性を有する第1の酵素を用いることを含む方法。

[18] 4 - ニトロ桂皮酸から4 - アミノ桂皮酸を製造する方法であって、配列番号7、9、11、13又は15で表されるアミノ酸配列に対して80%以上の配列相同性を有するアミノ酸配列からなり、且つ、4 - ニトロ桂皮酸を4 - アミノ桂皮酸に変換する活性を有する第2の酵素を用いることを含む方法。

[19] 配列番号1、3、又は5で表されるアミノ酸配列に対して80%以上の配列相同性を有するアミノ酸配列からなり、且つ、4 - ニトロフェニルアラニンを4 - ニトロ桂皮酸に変換する活性を有する第1の酵素をコードする核酸を担持するベクター。

10

20

30

40

50

[ 2 0 ] 配列番号 7、9、11、13 又は 15 で表されるアミノ酸配列に対して 80% 以上の配列相同性を有するアミノ酸配列からなり、且つ、4 - ニトロ桂皮酸を 4 - アミノ桂皮酸に変換する活性を有する第 2 の酵素をコードする核酸を担持するベクター。

[ 2 1 ] 配列番号 1、3、又は 5 で表されるアミノ酸配列に対して 80% 以上の配列相同性を有するアミノ酸配列からなり、且つ、4 - ニトロフェニルアラニン を 4 - ニトロ桂皮酸に変換する活性を有する第 1 の酵素を発現するよう改変された宿主細胞。

[ 2 2 ] 配列番号 7、9、11、13 又は 15 で表されるアミノ酸配列に対して 80% 以上の配列相同性を有するアミノ酸配列からなり、且つ、4 - ニトロ桂皮酸を 4 - アミノ桂皮酸に変換する活性を有する第 2 の酵素を発現するよう改変された宿主細胞。

【発明の効果】

10

【0012】

本発明によれば、グルコースから 4 - アミノ桂皮酸を合成する新規な方法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図 1】図 1 は、大腸菌での組換え産生後に精製した C a m P A L、L i e P A L、及び R g P A L のフェニルアラニン ( P h e ) 及び 4 - ニトロフェニルアラニン ( n - P h e ) に対する脱アンモニア酵素活性を示す表である。

【図 2】図 2 は、大腸菌での組換え産生後に休止菌体反応に供した C a m P A L、L i e P A L、及び R g P A L による 4 - ニトロフェニルアラニンから 4 - ニトロ桂皮酸への変換活性を示すグラフである。

20

【図 3】図 3 は、大腸菌での組換え産生後に休止菌体反応に供した C a m P A L による 4 - ニトロフェニルアラニンから 4 - ニトロ桂皮酸への変換反応の結果を経時的に示すグラフである。

【図 4】図 4 は、大腸菌での組換え産生後に休止菌体反応に供した s c F r m 2、s c H b n 1、及び c d F L D Z による 4 - ニトロ桂皮酸から 4 - アミノ桂皮酸への変換活性を示すグラフである。

【図 5】図 5 は、各菌体量及び各基質量における 4 - ニトロフェニルアラニンから 4 - ニトロ桂皮酸への変換活性を示す表である。

【図 6】図 6 は、C a m P A L 産生大腸菌を 1 . 2 L 培養後に反応器内での変換反応による 4 - ニトロフェニルアラニンから 4 - ニトロ桂皮酸への変換反応の結果を経時的に示したグラフである。

30

【図 7】図 7 は、精製した 4 - ニトロ桂皮酸の H P L C 分析の結果を示すグラフである。

【図 8】図 8 は、C a m P A L 産生大腸菌の培養液にグルコース、フルクトース及びグルセロールを添加して 4 - ニトロ桂皮酸から 4 - アミノ桂皮酸 ( 4 A C A ) への変換を行った際の結果を示すグラフである。

【図 9】図 9 は、C a m P A L 産生大腸菌による 4 - ニトロフェニルアラニンから 4 - アミノ桂皮酸への変換活性を示すグラフである。

【図 10】図 10 は、精製した 4 A C A 塩酸塩と 4 A C A ( 標品 ) の H P L C 分析の結果を示すグラフである。

40

【発明を実施するための形態】

【0014】

以下、本発明を具体的な実施の形態に即して詳細に説明する。但し、本発明は以下の実施の形態に束縛されるものではなく、本発明の趣旨を逸脱しない範囲において、任意の形態で実施することが可能である。

【0015】

なお、本明細書において「核酸」には、リボ核酸、デオキシリボ核酸、又は何れの核酸の修飾体も含まれる。また、核酸には、一本鎖又は二本鎖の何れも含まれる。また、本発明に係る核酸 ( 遺伝子 ) は、当業者に公知の公的機関のデータベース又は本明細書に開示する塩基配列に基づき作製したプライマー又はプローブ等を用いて、当業者に公知の任意

50

の方法で調製することができる。例えば、各種のPCRその他の当業者に公知のDNA増幅技術を用いることにより、該遺伝子のcDNAとして容易に得ることができる。あるいは、当業者であれば、本明細書中に開示する配列情報に基づいて、適宜既存技術を用いて、核酸を合成することができる。核酸（遺伝子）は、タンパク質又はポリペプチドをコードするものである。ここで、「コードする」とは、本発明に係るタンパク質又はポリペプチドをその活性を備えた状態で発現させるということを意味している。また、「コードする」とは、本発明に係るタンパク質を連続する構造配列（エクソン）としてコードすることと、該タンパク質を適当な介在配列（イントロン）を介してコードすることの両者を含む。

【0016】

10

[I. 4 - ニトロフェニルアラニンから4 - アミノ桂皮酸を製造する方法]

1. 概要

本発明の第一の要旨は、4 - ニトロフェニルアラニンから4 - アミノ桂皮酸を製造する方法（以下適宜「本発明の第一の方法」と略称する。）に関する。本発明の第一の方法は、少なくとも（1）4 - ニトロフェニルアラニンを4 - ニトロ桂皮酸に変換する工程、及び（2）4 - ニトロ桂皮酸を4 - アミノ桂皮酸に変換する工程を含む。

【0017】

グルコースから発酵によりフェニルアラニンを合成する方法（例えば米国特許出願公開第2001/0044139号：以下文献A、参照）、及び、フェニルアラニンをニトロ化して4 - ニトロフェニルアラニンを合成する方法（例えばTakayama et al., BCSJ, 17[3]:109-113：以下文献B、参照）は、何れも公知である。

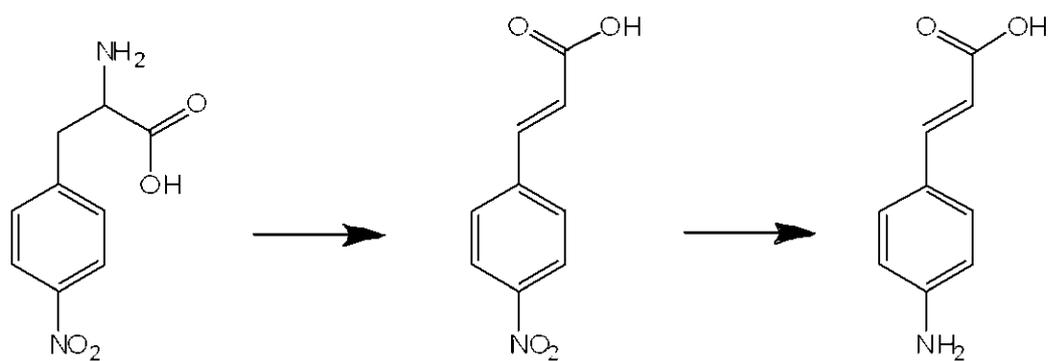
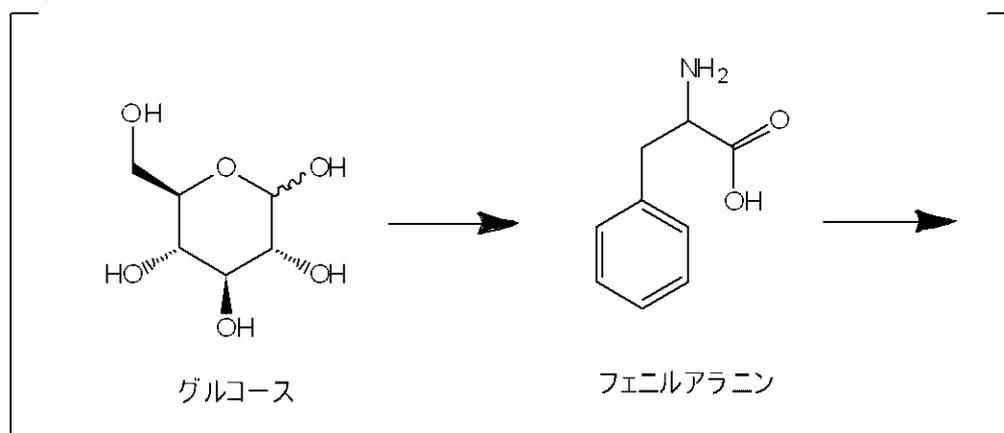
20

【0018】

そこで本発明者等は、出発原料として4 - ニトロフェニルアラニンに着目し、まずこれを4 - ニトロ桂皮酸に変換し、次いでこれを4 - アミノ桂皮酸に変換することで、グルコースからフェニルアラニン → 4 - ニトロフェニルアラニン → 4 - ニトロ桂皮酸を介して4 - アミノ桂皮酸を合成する新規な合成経路を確立できることに想到した。

【0019】

## 【化 2】



4-ニトロフェニルアラニン

4-ニトロ桂皮酸

4-アミノ桂皮酸

## 【0020】

本発明の第一の方法に含まれる2つの工程は、いずれも生物的手法、化学的手法等の各種の方法を用いることができる。

## 【0021】

また、本発明者等は、4-ニトロフェニルアラニンを4-ニトロ桂皮酸に変換する方法の検討に際し、生物由来の広範な酵素を対象として、4-ニトロフェニルアラニンを4-ニトロ桂皮酸に変換する酵素（フェニルアラニンアンモニアリアーゼ）を探索した。探索の結果、本発明者等は、チャノキ（*Camellia sinensis*）由来の酵素であるCamPAL、ムラサキ（*Lithospermum erythrorhizon*）由来の酵素であるLiePAL、及び、ロドトルラ・グルチニス（*Rhodotorula glutinis*）JN-1由来の酵素であるRgPALを選抜した。

30

## 【0022】

また、4-ニトロ桂皮酸を4-アミノ桂皮酸に変換する方法としては、公知の化学的方法によるニトロ基の還元反応を用いることができるが、本発明者等は更に、4-ニトロ桂皮酸を4-アミノ桂皮酸に変換する変換酵素（ニトロレダクターゼ）を探索した。探索の結果、本発明者等は、サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）由来の酵素であるscFrm2及びscHbn1、クロストリジウム・ディフィシレ（*Clostridium difficile*）由来の酵素であるcdFLDZ、並びに大腸菌（*Escherichia coli*）由来の酵素であるnfsA及びnfsBを選抜した。

40

## 【0023】

更に本発明者等は、これらの酵素を発現する宿主細胞を用いて、4-ニトロフェニルアラニンを4-ニトロ桂皮酸に、次いで4-ニトロ桂皮酸を4-アミノ桂皮酸に変換することに成功し、本発明の第一の方法を完成させた。

## 【0024】

本発明の第一の方法を、前述した公知の方法である、グルコースの発酵によるフェニル

50

アラニンの合成方法（前記文献 A 参照）、及び、フェニルアラニンのニトロ化による 4 - ニトロフェニルアラニンの合成方法（前記文献 B 参照）と組み合わせれば、グルコースからフェニルアラニン 4 - ニトロフェニルアラニン 4 - ニトロ桂皮酸を介する新規な合成経路により、4 - アミノ桂皮酸を製造することが可能となる。しかも、後述の実施例に示すように、本発明の第一の方法を介するグルコースからの 4 - アミノ桂皮酸の合成は、本発明者等による従来法（特許文献 2 及び 3）と比較して、反応速度や反応効率等の面で優れており、有利であると言える。

【0025】

以下、本発明の第一の方法について、詳細に説明する。

【0026】

## 2. 出発物質：4 - ニトロフェニルアラニン

本発明の第一の方法では、出発原料として 4 - ニトロフェニルアラニンを用いる。4 - ニトロフェニルアラニンの種類は制限されず、天然のものでも合成されたものでもよい。4 - ニトロフェニルアラニンを合成する種々の手法については後述する。

【0027】

## 3. 工程（1）：4 - ニトロフェニルアラニンの 4 - ニトロ桂皮酸への変換

本発明の第一の方法では、まず工程（1）として、4 - ニトロフェニルアラニンを 4 - ニトロ桂皮酸へと変換する。本工程（1）を実施する手法は制限されず、例えば生物的手法や化学的手法等、任意の手法を用いることができる。中でも、本発明では 4 - ニトロフェニルアラニンを 4 - ニトロ桂皮酸へと変換する酵素（ニトロフェニルアラニンアンモニアリアーゼ：以下適宜「第一の酵素」という。）を用いて、工程（1）を実施することが好ましい。

【0028】

前記第一の酵素の例としては、チャノキ（*Camellia sinensis*）由来の酵素である *C a m P A L*、ムラサキ（*Lithospermum erythrorhizon*）由来の酵素である *L i e P A L*、及び、酵母ロドトルラ・グルチニス（*Rhodotorula glutinis*）*J N - 1* 由来の酵素である *R g P A L* が挙げられる。*C a m P A L* タンパク質のアミノ酸配列を配列番号 1 に、これをコードする *C a m P A L* 遺伝子の塩基配列の例（大腸菌での発現用にコドンで補正したもの）を配列番号 2 にそれぞれ示す。また、*L i e P A L* タンパク質のアミノ酸配列を配列番号 3 に、これをコードする *L i e P A L* 遺伝子の塩基配列の例（大腸菌での発現用にコドンで補正したもの）を配列番号 4 にそれぞれ示す。また、*R g P A L* タンパク質のアミノ酸配列を配列番号 5 に、これをコードする *R g P A L* 遺伝子の塩基配列の例（大腸菌での発現用にコドンで補正したもの）を配列番号 6 にそれぞれ示す。

【0029】

*C a m P A L*、*L i e P A L*、及び *R g P A L* は、後述の実施例に示すように、生物由来の既知のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ（phenylalanine ammonia lyase：*P A L*）の中から、本発明者等が探索して得られた酵素である。*P A L* はフェニルアラニンを基質とし、これを脱アンモニアして桂皮酸を産生する酵素である。*P A L* によるフェニルアラニンの脱アンモニアにより桂皮酸を産生する反応と、ここで目的とする 4 - ニトロフェニルアラニンの脱アンモニアにより 4 - ニトロ桂皮酸を産生する反応とは、類似するものの、後者では基質のベンゼン環の 4 位にあるニトロ基が存在する点で異なる。予想外にも、*C a m P A L*、*L i e P A L*、及び *R g P A L* は、後述の実施例に示すように、優れた 4 - ニトロフェニルアラニンから 4 - ニトロ桂皮酸への変換活性を有し、本発明において好適に使用することができる。

【0030】

なお、前述のように *C a m P A L*、*L i e P A L*、及び *R g P A L* は公知の酵素であり、そのアミノ酸配列も公知であるが、これらがニトロ化合物を基質として利用でき、4 - ニトロフェニルアラニンから 4 - ニトロ桂皮酸への変換活性を有することは、これまで知られておらず、本発明者等が初めて見出した知見である。

【0031】

10

20

30

40

50

前記第一の酵素の例としては、C a m P A L、L i e P A L、及びR g P A Lのみならず、それらの類似体であって、4 - ニトロフェニルアラニンをも4 - ニトロ桂皮酸へと変換する活性を維持するポリペプチドも挙げられる。C a m P A L、L i e P A L、又はR g P A Lの類似体としては、例えばそのホモログ（オルソログ及びパラログを含む）、又はそのフラグメントが挙げられる。

#### 【 0 0 3 2 】

具体的に、第一の酵素は、配列番号1、3、又は5のアミノ酸配列と、少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、又は少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、特に好ましくは少なくとも99%、最も好ましくは100%の配列相同性を有することが望ましい。また、第一の酵素は、配列番号1、3、又は5のアミノ酸配列と、少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、又は少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、特に好ましくは少なくとも99%、最も好ましくは100%の配列同一性を有することが望ましい。

10

#### 【 0 0 3 3 】

ここで、2つのアミノ酸配列の「相同性」とは、両アミノ酸配列をアラインメントした際に各対応箇所に同一又は類似のアミノ酸残基が現れる比率であり、2つのアミノ酸配列の「同一性」とは、両アミノ酸配列をアラインメントした際に各対応箇所に同一のアミノ酸残基が現れる比率である。なお、2つのアミノ酸配列の「相同性」及び「同一性」は、例えばBLAST (Basic Local Alignment Search Tool) プログラム (Altschul et al., J. Mol. Biol., (1990), 215(3):403 10) 等を用いて求めることが可能である。

20

#### 【 0 0 3 4 】

また、前記第一の酵素は、配列番号1、3、又は5のアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されてなるアミノ酸配列からなるアミノ酸配列を有するポリペプチドであってもよい。なお、本明細書において「アミノ酸配列において1個又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加」しているとは、当該アミノ酸配列中のアミノ酸が、そのポリペプチドの構造又は機能に有意に影響することなく改変していることを指す。また、「数個」とは、通常2~50個、好ましくは2~20個、より好ましくは2~10個、更に好ましくは2~5個の変異（欠失、置換又は付加）が存在することを指す。

#### 【 0 0 3 5 】

また、前記第一の酵素は、配列番号1、3、又は5のアミノ酸配列をコードする塩基配列と相補的な塩基配列からなる核酸とストリンジントな条件下でハイブリダイズする核酸によりコードされるポリペプチドであってもよい。なお、本明細書において「ストリンジントな (stringent) 条件」とは、核酸同士の選択的且つ検出可能な特異的結合を可能とする条件であり、塩濃度、溶媒（例えばホルムアミド等の有機溶媒）、温度、その他の公知の条件の適当な組み合わせによって定義される。なお、「ストリンジントな条件」は当業者には周知であるが、具体的にはT.Maniatisら編、Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd ed.(1989) Cold Spring Harbor Laboratory等を参照のこと。具体的な「ストリンジントな条件」の例としては、約40~45、最適には約42で、5×SSPE、0.3%のSDS、200µg/mLの剪断変性サケ精子DNA中で、且つ、極めて低度及び低度のストリンジェンシーの場合は25%のホルムアミド、培地及び中度~高度のストリンジェンシーの場合は35%のホルムアミド、高度及び極めて高度のストリンジェンシーの場合は50%のホルムアミド中で、標準的なサザンプロット法に従って12~24時間のハイブリダイゼーションを行う。その後、最終的には担体材料を2×SSC、0.2%のSDS中で、45（極めて低度のストリンジェンシー）、50（低度のストリンジェンシー）、55（中度のストリンジェンシー）、60（中度~高度のストリンジェンシー）、65（高度のストリンジェンシー）、又は70（極めて高度のストリンジェンシー）で、15分間ずつ三回洗浄する。なお、ハイブリダイゼーションは、当業界で公知の方法やそれに準じる方法に従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうこ

30

40

50

とができる。

【0036】

前記第一の酵素を調製する方法は制限されない。前記の第一の酵素を産出する生物から目的の酵素を抽出して用いてもよい。また、当業者に公知の公的機関のデータベースに登録されたCamPAL、LiePAL、又はRgPAL遺伝子の塩基配列や、本明細書に開示するCamPAL、LiePAL、又はRgPAL遺伝子の塩基配列（それぞれ配列番号2、4、及び6）を用いて、当業者に公知の各種の手法、例えば化学合成法や遺伝子工学的手法を用いて調製することができる。

【0037】

具体的に、CamPAL、LiePAL、又はRgPALについては、例えばチャノキ（*Camellia sinensis*）、ムラサキ（*Lithospermum erythrorhizon*）、又はロドトルラ・グルチニス（*Rhodotorula glutinis*）JN-1のゲノムライブラリーから、当業者に公知のポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction：PCR）等の核酸増幅技術を用いることにより、CamPAL、LiePAL、又はRgPAL遺伝子をコードする核酸を調製した上で、これらを当業者に公知の手法でプラスミドやウイルス等の各種のベクターに組み込み、適切な宿主細胞に遺伝子組換えにより導入して発現させることにより、CamPAL、LiePAL、又はRgPALを調製することが可能である。なお、宿主細胞としては、原核細胞でも真核細胞でもよく、原核細胞の場合は真正細菌でも古細菌でもよく、真核細胞の場合は植物細胞でも動物細胞でも真菌細胞でも原生生物細胞でもよい。

【0038】

また、CamPAL、LiePAL、又はRgPALの類似体については、例えば、当業者に公知の公的機関のデータベースに登録されたCamPAL、LiePAL、又はRgPAL遺伝子の塩基配列や、本明細書に開示するCamPAL、LiePAL、又はRgPAL遺伝子の塩基配列（それぞれ配列番号2、4、及び6）からなる核酸に対し、変異原となる薬剤と接触作用させる方法、紫外線を照射する方法、遺伝子工学的な手法等を用いて変異を導入することにより、CamPAL、LiePAL、又はRgPALの類似体をコードする核酸を調製する。中でも、遺伝子工学的手法の一つである部位特異的変異誘発法は、特定の位置に特定の変異を導入できることから有用である。こうして得られたCamPAL、LiePAL、又はRgPALの類似体をコードする核酸を、前述と同様に当業者に公知の手法でプラスミドやウイルス等の各種のベクターに組み込み、適切な宿主細胞に遺伝子組換えにより導入して発現させることにより、CamPAL、LiePAL、又はRgPALの類似体を調製することが可能である。

【0039】

なお、遺伝子工学的な手法については、例えばSambrook, J. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989等の記載を参照することができる。

【0040】

前記第一の酵素を用いて工程（1）を実施する手法は特に制限されない。第一の酵素を、酵素反応を生じさせるような条件下で、4-ニトロフェニルアラニンに作用させ、4-ニトロ桂皮酸へと変換させればよい。なお、4-ニトロフェニルアラニンとしては、4-ニトロフェニルアラニンを含む天然生成物や合成生成物等の組成物を精製せずそのまま用いてもよいが、斯かる組成物から当業者に公知の各種の手法で4-ニトロフェニルアラニンを精製して用いてもよい。

【0041】

前記第一の酵素を4-ニトロフェニルアラニンに作用させる手法の例としては、上記手順により調製された第一の酵素を単離・精製して用いてもよいが、前述の手順により第一の酵素を発現するように宿主細胞を改変して得られた遺伝子組換え細胞（以下適宜「第一の細胞」という。）をそのまま用いてもよい。後者の場合、特に宿主細胞として細菌を用い、その休止菌体を用いて4-ニトロフェニルアラニンと共存させ、休止菌体に含まれる第一の酵素を4-ニトロフェニルアラニンに作用させて4-ニトロ桂皮酸へと変換させる手

法（以下適宜「休止菌体反応」という。）が好ましい。斯かる休止菌体反応については後述する。

【0042】

また、第一の酵素を発現する宿主細胞として細菌を用い、その培養液を用いて4-ニトロフェニルアラニンと共存させ、培養液に含まれる第一の酵素を4-ニトロフェニルアラニンに作用させて4-ニトロ桂皮酸へと変換させる手法を取ることにもできる。

【0043】

前記第一の酵素の酵素反応を生じさせるような条件とは、制限されるものではないが、例えば水性溶媒中であれば、そのpHは特に制限はされないが、通常7.5以上、中でも8以上が好ましく、また、通常9.5以下、更には9以下が好ましい。また、反応を行う温度は特に制限はされないが、通常27以上、中でも30以上、更には32以上、また、通常42以下、中でも37以下で反応を行うことが好ましく例示できる。

10

【0044】

4. 工程(2) : 4-ニトロ桂皮酸の4-アミノ桂皮酸への変換

本発明の第一の方法では、次に工程(2)として、4-ニトロ桂皮酸を4-アミノ桂皮酸へと変換する。本工程(2)を実施する手法も制限されず、例えば生物的手法や化学的手法等、任意の手法を用いることができる。中でも、本発明では4-ニトロ桂皮酸を4-アミノ桂皮酸へと変換する酵素(ニトロレダクターゼ：以下適宜「第二の酵素」という。)を用いて、工程(2)を実施することが好ましい。

【0045】

前記第二の酵素の例としては、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来の酵素である *scFr m 2* 及び *scH b n 1*、クロストリジウム・ディフィシレ (*Clostridium difficile*) 由来の酵素である *cdFLD Z*、並びに大腸菌 (*Escherichia coli*) 由来の酵素である *nf s A* 及び *nf s B* 等が挙げられる。*scFr m 2* タンパク質のアミノ酸配列を配列番号7に、これをコードする *scFr m 2* 遺伝子の塩基配列の例を配列番号8にそれぞれ示す。また、*scH b n 1* タンパク質のアミノ酸配列を配列番号9に、これをコードする *scH b n 1* 遺伝子の塩基配列の例を配列番号10にそれぞれ示す。また、*cdFLD Z* タンパク質のアミノ酸配列を配列番号11に、これをコードする *cdFLD Z* 遺伝子の塩基配列の例を配列番号12にそれぞれ示す。また、*nf s A* タンパク質のアミノ酸配列を配列番号13に、これをコードする *nf s A* 遺伝子の塩基配列の例を配列番号14にそれぞれ示す。また、*nf s B* タンパク質のアミノ酸配列を配列番号15に、これをコードする *nf s B* 遺伝子の塩基配列の例を配列番号16にそれぞれ示す。

20

30

【0046】

*scFr m 2*、*scH b n 1*、*cdFLD Z*、*nf s A* 及び *nf s B* は、後述の実施例に示すように、生物由来の既知のニトロレダクターゼ及びエン酸レダクターゼ (enoate reductase) の中から、本発明者等が探索して得られた酵素である。これらの酵素は、予想外にも、後述の実施例に示すように、4-ニトロ桂皮酸から4-アミノ桂皮酸への優れた変換活性を有し、本発明において好適に使用することができる。

【0047】

なお、前述のように *scFr m 2*、*scH b n 1*、*cdFLD Z*、*nf s A* 及び *nf s B* はニトロレダクターゼ又はエン酸レダクターゼとして公知の酵素であり、そのアミノ酸配列も公知であるが、これらが4-ニトロ桂皮酸から4-アミノ桂皮酸への変換活性を有し、ニトロレダクターゼとしても使用できることはこれまで知られておらず、本発明者等が初めて見出した知見である。

40

【0048】

前記第二の酵素の例としては、これらの酵素自体のみならず、それらの酵素の類似体であって、4-ニトロ桂皮酸を4-アミノ桂皮酸へと変換する活性を維持するポリペプチドも挙げられる。前記の類似体としては、例えばそのホモログ(オルソログ及びパラログを含む)、又はそのフラグメントが挙げられる。

50

## 【0049】

具体的に、前記第二の酵素は、配列番号7、9、11、13又は15のアミノ酸配列と、少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、又は少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、特に好ましくは少なくとも99%、最も好ましくは100%の配列相同性を有することが望ましい。また、第二の酵素は、配列番号7、9、11、13又は15のアミノ酸配列と、少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、又は少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、特に好ましくは少なくとも99%、最も好ましくは100%の配列同一性を有することが望ましい。なお、2つのアミノ酸配列の「相同性」及び「同一性」については、先に説明したとおりである。

10

## 【0050】

また、前記第二の酵素は、配列番号7、9、11、13又は15のアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されてなるアミノ酸配列からなるアミノ酸配列を有するポリペプチドであってもよい。なお、本明細書において「アミノ酸配列において1個又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加」しているとは、先に説明したとおりである。

## 【0051】

また、前記第二の酵素は、配列番号7、9、11、13又は15のアミノ酸配列をコードする塩基配列と相補的な塩基配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸によりコードされるポリペプチドであってもよい。なお、本明細書において「ストリンジェントな (stringent) 条件」とは、先に説明したとおりである。

20

## 【0052】

前記第二の酵素を調製する方法は制限されない。前記の第二の酵素を産出する生物から目的の酵素を抽出して用いてもよい。しかし、当業者に公知の公的機関のデータベースに登録された前記第二の酵素の遺伝子の塩基配列や、本明細書に開示する配列番号8、10、12、14及び16の遺伝子の塩基配列を用いて、当業者に公知の各種の手法、例えば化学合成法や遺伝子工学的手法を用いて調製することができる。その具体的な手法、特に遺伝子工学的な手法については、先に詳述したとおりである。

## 【0053】

前記第二の酵素を用いて工程(2)を実施する手法は特に制限されない。第二の酵素を、酵素反応を生じさせるような条件下で、工程(1)で得られた4-ニトロ桂皮酸に作用させ、4-アミノ桂皮酸へと変換させればよい。なお、工程(1)で得られた4-ニトロ桂皮酸としては、4-ニトロ桂皮酸を含む工程(1)の反応生成物との組成物を精製せずそのまま用いてもよいが、斯かる反応生成物から当業者に公知の各種の手法で4-ニトロ桂皮酸を精製して用いてもよい。

30

## 【0054】

前記第二の酵素を4-ニトロ桂皮酸に作用させる手法の例としては、上記手順により調製された第二の酵素 (s c F r m 2、s c H b n 1、c d F L D Z、n f s A 若しくは n f s B 又はその類似体) を単離・精製して用いてもよいが、前述の手順により第二の酵素を発現するように宿主微生物を改変して得られた遺伝子組換え細胞 (以下適宜「第二の細胞」という。) をそのまま用いてもよい。後者の場合、特に宿主として細菌を用い、その休止菌体を用いて4-ニトロ桂皮酸と共存させ、休止菌体に含まれる第二の酵素を4-ニトロ桂皮酸に作用させて4-アミノ桂皮酸へと変換させる手法 (休止菌体反応) が好ましい。斯かる休止菌体反応については後述する。また、宿主細胞として細菌を用い、その培養液を用いて4-ニトロ桂皮酸と共存させ、培養液に含まれる第一の酵素を4-ニトロ桂皮酸に作用させて4-アミノ桂皮酸へと変換させる手法も好ましい。この場合、前記の細菌としては大腸菌が好ましい。

40

## 【0055】

なお、前記第二の酵素の酵素反応を生じさせるような条件とは、制限されるものではないが、例としては以下が挙げられる。即ち、水性溶媒中であれば、そのpHは特に制限は

50

されないが、通常6.5以上、中でも7.0以上が好ましく、また、通常8.5以下、更には8.0以下が好ましい。また、反応を行う温度は特に制限はされないが、通常27以上、中でも30以上、更には32以上、また、通常42以下、中でも37以下で反応を行うことが好ましく例示できる。

【0056】

#### 5. 休止菌体反応

本発明の第一の方法では、前記第一の酵素を用いて工程(1)を実施する際、及び/又は、前記第二の酵素を用いて工程(2)を実施する際に、前記の第一及び/又は第二の酵素を発現する第一及び/又は第二の細胞として細菌の休止菌体を用いた反応(休止菌体反応)を用いることが好ましい(なお、第一の酵素を発現する細菌を以下「第一の細菌」といい、第二の酵素を発現する細菌を以下「第二の細菌」という)。

10

【0057】

ここで、細菌の「休止菌体」とは、斯かる細菌の増殖を伴わない菌体を意味する。休止菌体の例としては、細菌を培養して得られた培養菌体や、斯かる培養菌体を凍結乾燥やスプレードライによって粉末にした粉末菌体、斯かる培養菌体を担体に固定化した固定化菌体等が挙げられる。これらの二種以上を組み合わせて使用してもよい。休止菌体の具体例としては、細菌を培養して得られる培養液を遠心分離によって培養上清と菌体とに分け、得られた菌体を生理食塩水で洗浄し、所望の菌体濁度(例えば600nmでの吸光度が40)となるように滅菌精製水に懸濁した休止菌体懸濁液を用いることができる。また、斯かる休止菌体懸濁液を凍結乾燥やスプレードライによって粉末にした粉末菌体や、斯かる培養菌体懸濁液中の培養菌体を担体に固定化した固定化菌体等も用いることができる。

20

【0058】

斯かる第一又は第二の細菌の休止菌体を、対応する基質(第一の細菌の場合は4-ニトロフェニルアラニン、第二の細菌の場合は4-ニトロ桂皮酸)又はこれを含む組成物(例えば天然生成物、反応生成物等)と、第一又は第二の酵素の酵素反応を生じさせるような条件下で共存させることにより、第一又は第二の細菌の休止菌体に含まれる第一又は第二の酵素を対応する基質に作用させる。第一又は第二の酵素の酵素反応を生じさせるような条件とは、制限されるものではないが、例えばpHが通常6.5以上、中でも7以上、また、通常9.5以下、更には9以下の水性溶媒中、通常27以上、中でも30以上、更には32以上、また、通常42以下、中でも37以下の温度で反応を行うことが好ましく例示できる。

30

【0059】

なお、本発明の第一の方法では、工程(2)において4-ニトロ桂皮酸を4-アミノ桂皮酸へと変換する手法として、化学的手法を用いることもできる。化学的手法としては、特に限定されることはなく、既知の方法を用いることができる。具体例としては、ニトロ基をアミノ基に変換する化学反応を用いて、4-ニトロ桂皮酸のニトロ基を還元すればよい。ニトロ基の還元方法としては、特に限定はされないが、例えばBechamp法(例えばA. J. Ann. Chim. Phys. 1854, 42, 186.)や、不均一系接触還元法等の公知の方法を用いることができる。なお、4-ニトロ桂皮酸としては、前記工程(1)で得られた4-ニトロ桂皮酸をそのまま用いてもよいが、公知の方法で適宜精製してから用いてもよい。

40

【0060】

#### 6. その他

以上の手順により、(1)4-ニトロフェニルアラニンを4-ニトロ桂皮酸に変換する工程、及び(2)4-ニトロ桂皮酸を4-アミノ桂皮酸に変換する工程を実施することにより、4-ニトロフェニルアラニンから4-アミノ桂皮酸を製造することができる。なお、工程(2)の終了後、当業者に公知の各種の手法で反応生成物から4-アミノ桂皮酸を単離・精製してもよい。

【0061】

なお、以上の説明はあくまでも本発明の第一の方法の実施の一態様に過ぎない。当業者

50

であれば容易に理解するように、上述の態様に適宜変更を加えて、本発明の第一の方法を実施することが可能である。

【0062】

例えば、本発明の第一の方法では、前記工程(1)と前記工程(2)を適宜組み合わせ実施することができる。その組合せは限定されるものではないが、通常は、前記工程(1)において前記第一の酵素を用いた酵素反応を実施し、前記工程(2)において前記第二の酵素を用いた酵素反応又は前記の化学的手法を実施する。このうち前記工程(1)では、前記第一の細菌の共存下で酵素反応を行う方法、又は、第一の細菌の休止菌体反応を行うことが好ましい。

【0063】

なお、前記工程(1)で第一の細菌の共存下で酵素反応を行う場合は、前記工程(2)では前記第二の細菌の共存下で酵素反応を行うか、又は化学的手法で行うことが好ましい。中でも、前記第二の細菌の共存下で酵素反応を行えば、一貫で双方の酵素反応を行うことができ、効率面でより好ましい。また、この場合には第二の細菌として大腸菌を用いることが、コスト低減の観点で更に好ましい。

【0064】

一方、前記工程(1)で第一の細菌の休止菌体を行う場合には、前記工程(2)では前記第二の細菌の休止菌体反応を行うか、又は化学的手法を行うことが好ましい。中でも、化学的手法で行うことが、4-ニトロ桂皮酸の4-アミノ桂皮酸への変換効率、生産コスト(原材料費、設備投資費、及び人件費等)、及び生産時のCO<sub>2</sub>削減等の点でより好ましい。

【0065】

また、以上の説明では工程(1)の実施後に工程(2)を実施する態様を説明したが、工程(1)と工程(2)とを同時に実施することも可能である。この場合、第一及び第二の酵素を、酵素反応を生じさせるような条件下で4-ニトロフェニルアラニンに作用させ、第一の酵素による4-ニトロフェニルアラニンから4-ニトロ桂皮酸への変換と、第二の酵素による4-ニトロ桂皮酸から4-アミノ桂皮酸への変換とを並行して実施すればよい。この場合、単離・精製した第一及び第二の酵素を併用してもよく、第一及び第二の酵素をそれぞれ発現する第一及び第二の細胞を併用してもよく、更には、第一及び第二の酵素を共に発現する単一の遺伝子組換え細胞を用いてもよい(これを以下「第三の細胞」という)。第一及び第二の酵素を共に発現する第三の細胞は、第一及び第二の酵素をコードする遺伝子、或いはこれらの遺伝子をそれぞれ担持する第一及び第二のベクターを、単一の宿主細胞に導入し、第一及び第二の酵素を共に発現するように宿主細胞を改変して得ることができる。

【0066】

【II. グルコースから4-アミノ桂皮酸を製造する方法】

本発明の第二の要旨は、グルコースから4-アミノ桂皮酸を製造する方法(以下適宜「本発明の第二の方法」と略称する。)に関する。本発明の第二の方法は、少なくとも(a)グルコースからフェニルアラニンを産生する工程、(b)前記(a)で得られたフェニルアラニンをニトロ化して4-ニトロフェニルアラニンに変換する工程、及び、(c)本発明の第一の方法により、前記(b)で得られた4-ニトロフェニルアラニンから4-アミノ桂皮酸を製造する工程を含む。

【0067】

工程(a)における、グルコースからフェニルアラニンを合成する方法としては、例えば前記の文献Aに記載の方法を用いることができる。

【0068】

工程(b)における、フェニルアラニンから4-ニトロフェニルアラニンを合成する方法としては、例えば前記の文献Bに記載の方法を用いることができる。

【0069】

工程(c)における、4-ニトロフェニルアラニンから4-アミノ桂皮酸を合成する方

10

20

30

40

50

法としては、前述した本発明の第一の方法を用いることができる。

【0070】

[III. フェニルアラニンから4-アミノ桂皮酸を製造する方法]

本発明の第三の要旨は、フェニルアラニンから4-アミノ桂皮酸を製造する方法（以下適宜「本発明の第三の方法」と略称する。）に関する。本発明の第三の方法は、少なくとも（b）フェニルアラニンをニトロ化して4-ニトロフェニルアラニンに変換する工程、及び、（c）本発明の第一の方法により、前記（b）で得られた4-ニトロフェニルアラニンから4-アミノ桂皮酸を製造する工程を含む。

【0071】

工程（b）における、フェニルアラニンから4-ニトロフェニルアラニンを合成する方法については、本発明の第二の方法について前述したとおりである。

【0072】

工程（c）における、4-ニトロフェニルアラニンから4-アミノ桂皮酸を合成する方法としては、前述した本発明の第一の方法を用いることができる。

【0073】

[IV. 4-ニトロフェニルアラニンから4-ニトロ桂皮酸を製造する方法]

本発明の第四の要旨は、フェニルアラニンから4-ニトロ桂皮酸を製造する方法（以下適宜「本発明の第四の方法」と略称する。）に関する。本発明の第四の方法は、少なくとも前述の第一の酵素を用いて、フェニルアラニンを4-ニトロ桂皮酸に変換する工程を含む。斯かる工程の詳細については、本発明の第一の方法の工程（1）として先に詳述したとおりである。

【0074】

[V. 4-ニトロ桂皮酸から4-アミノ桂皮酸を製造する方法]

本発明の第五の要旨は、4-ニトロ桂皮酸から4-アミノ桂皮酸を製造する方法（以下適宜「本発明の第五の方法」と略称する。）に関する。本発明の第五の方法は、少なくとも前述の第二の酵素を用いて、4-ニトロ桂皮酸を4-アミノ桂皮酸に変換する工程を含む。斯かる工程の詳細については、本発明の第一の方法の工程（2）として先に詳述したとおりである。

【0075】

[VI. ベクター]

本発明の第六の要旨は、前述の第一及び/又は第二の酵素をコードする遺伝子を担持するベクター（なお、第一の酵素をコードする遺伝子を担持するベクターを以下「第一のベクター」といい、第二の酵素をコードする遺伝子を担持するベクターを以下「第二のベクター」といい、第一の酵素をコードする遺伝子及び第二の酵素をコードする遺伝子を共に担持するベクターを以下「第三のベクター」という。）に関する。

【0076】

第一～第三のベクターは、前述の第一及び/又は第二の酵素をコードする遺伝子を担持すると共に、これらの遺伝子を宿主細胞内に導入し、発現可能な状態とすることが可能であれば、その種類は限定されない。例えば、宿主細胞のゲノム内に組み込まれるベクターでも、宿主細胞の細胞質内に取り込まれつつ、宿主細胞のゲノムとは独立に共存し、宿主細胞の細胞分裂に従って自律的に複製するベクターであってもよい。また、線状ベクターでも環状ベクターでもよく、一本鎖ベクターでも二本鎖ベクターでもよく、DNAベクターでもRNAベクターでもよい。更には、プラスミドベクターでも、コスミドベクターでも、フォスミドベクターでも、ウイルスベクターでも、人工染色体ベクターでも、アグロバクテリウム等の細菌ベクターでも、更にはこれら複数の組合せによるバイナリーベクターでもよい。斯かるベクターの種類や構成、構築法等は当業者には周知であり、遺伝子や宿主微生物細胞等の条件に応じて適宜選択すればよい。

【0077】

第一～第三のベクターは、前述の第一及び/又は第二の酵素をコードする遺伝子に加えて、宿主細胞中で前記遺伝子の発現を調節する調節配列を更に含むことが好ましい。斯か

10

20

30

40

50

る調節配列としては、プロモータ、ターミネータ、エンハンサ、ポリA付加シグナル、5' - UTR (非翻訳領域)、標識又は選抜マーカー遺伝子、マルチクローニング部位、複製開始点等が挙げられる。第一～第三のベクターにおいては、これらの調節配列が、前述の第一及び/又は第二の酵素をコードする遺伝子と作動可能に連結されることにより、宿主細胞中で前記遺伝子を自律的に発現することが可能な発現カセットとして構築されることが好ましい。斯かる調節配列の種類や構成、構築法等は当業者には周知であり、遺伝子や宿主細胞等の条件に応じて適宜選択すればよい。

【0078】

#### [VII. 細胞]

本発明の第七の要旨は、前述の第一及び/又は第二の酵素を発現するよう宿主細胞を改変して得られる細胞(なお、前述のように、第一の酵素を発現する細胞を「第一の細胞」といい、第二の酵素を発現する細胞を「第二の細胞」といい、第一及び第二の酵素を共に発現する細胞を「第三の細胞」という。)に関する。

【0079】

第一～第三の細胞の元となる宿主細胞の種類は制限されず、原核細胞でも真核細胞でもよく、原核細胞の場合は真正細菌でも古細菌でもよく、真核細胞の場合は植物細胞でも動物細胞でも真菌細胞でも原生生物細胞でもよい。但し、前述の休止菌体反応を行う場合には、宿主細胞としては細菌を用いることが好ましい。

【0080】

これらの宿主細胞に第一及び/又は第二の酵素をコードする遺伝子を導入することにより、第一及び/又は第二の酵素を発現する第一～第三の細胞を得ることができる。導入する遺伝子としては、前述の第一及び/又は第二の酵素をコードする遺伝子をそのまま用いてもよく、或いはこれらの遺伝子を担持する前記の第一～第三のベクターを用いてもよい。遺伝子導入の手法としては、宿主細胞にベクターを感染させる方法や、エレクトロポレーション法、パーティクルガン(ボンバードメント)法、バキュームインフィルトレーション法等の物理的手法、更にはCRISPR/Cas9等のゲノム編集法等を用いることができる。

【0081】

こうして得られた第一～第三の細胞は、第一及び/又は第二の酵素を一過的に発現するものであってもよく、恒常的に発現するものであってもよい。また、多細胞真核生物の細胞の場合は、これらの遺伝子を発生の全ての段階で発現するものであってもよく、特定の段階のみで発現するものであってもよい。更には、これらの遺伝子を全ての組織・器官で発現するものであってもよく、特定の組織・器官のみで発現するものであってもよい。こうした遺伝子発現時期・部位の制御は、例えば調節配列を適切に選択することにより行うことができる。

【0082】

なお、本発明における第一～第三の細胞には、第一及び/又は第二の酵素を発現するよう改変された第一世代の細胞のみならず、斯かる細胞が分裂して得られた次代以降の細胞や、更には斯かる細胞を含む当初個体の有性生殖又は無性生殖により得られる子孫(クローンを含む)の細胞も含まれることとする。また、植物細胞の場合には、当初植物体の繁殖材料(例えば、種子、果実、切穂、塊茎、塊根、株、カルス、プロトプラスト等)から作出される子孫(クローンを含む)の細胞も含まれることとする。

【実施例】

【0083】

以下、実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明する。但し、本発明は以下の実施例にも束縛されるものではなく、本発明の趣旨を逸脱しない範囲において、任意の形態で実施することが可能である。

【0084】

なお、以下の実験では特に別記無き限り、大腸菌(Escherichia coli)株としてBL21(DE3)[Novagen, 遺伝子型F, ompT, hsdSB (rB mB), gal (cl857, ind1, Sam

10

20

30

40

50

7, nin5, lacUV5 T7gene1), dcm (DE3)] を使用した。また、大腸菌の培養には以下の組成のLB培地 (pH7.0)、又はこれに別記の成分を添加した培地を、オートクレーブを用いて121、15分間滅菌してから用いた。

【0085】

【表1】

LB培地 (pH7.0)	
トリプシン	10g/L
イーストエクストラクト	5g/L
塩化ナトリウム	10g/L

【0086】

なお、以下の各実施例で使用する高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の測定条件吸光光度計による酵素活性の評価条件を以下に記す。

【0087】

[ 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 測定条件 ]

装置： Hewlett Packard社製 1200 infinity series  
 カラム： Millipore Merck社製 Purospher STAR RP 18 endcapped カラム  
 検出波長： 280 nm  
 溶離液A： 20 mMリン酸カリウム (pH7.0)  
 溶離液B： 100%メタノール  
 プログラム： 0分 (A : B = 98% : 2%)  
 7分 (A : B = 98% : 2%)  
 12分 (A : B = 50% : 50%)  
 17分 (A : B = 50% : 50%)  
 19分 (A : B = 98% : 2%)  
 23分 (A : B = 98% : 2%)

20

【0088】

[ 吸光光度計による酵素活性の評価条件 ]

装置： BECKMAN COULTER社製DU800 UV/Vis Spectrophotometer  
 酵素量： 2 mg / mL  
 緩衝溶液： 50 mM Tris - HClバッファー (pH = 8.6)  
 基質濃度： 0.3 mM ~ 9.6 mM  
 容量： 200  $\mu$ L  
 測定波長： 4 - ニトロフェニルアラニンから4 - ニトロ桂皮酸 380 nm  
 フェニルアラニンから桂皮酸 305 nm  
 測定時間： 10分  
 測定温度： 25

30

【0089】

[ 実施例1 ]

40

[ I . 4 - ニトロフェニルアラニンから4 - ニトロ桂皮酸への変換 ]

1 . プラスミドの構築及び大腸菌への導入

( 1 ) pET28a - CamPALの構築及び大腸菌への導入

チャノキ (Camellia sinensis) 由来の酵素であるCamPALを、公知のポリヌクレオチド合成法により人工合成し、引き続き制限酵素Nde I及びEcoRIにより制限処理した。この制限処理したCamPALを、制限酵素Nde I及びEcoRIにより制限処理したプラスミドpET28a (Novagen社製) (以下、制限処理pET28aという) に対して、DNAライゲーションキットLigation High Ver.2 (東洋紡社製) を用いて連結し、pET28a - CamPALを作製した。得られたpET28a - CamPAL

を、ヒートショックトランスフォーメーション法により大腸菌株 B L 2 1 ( D E 3 ) に導入した。得られた C a m P A L 産生大腸菌株を培養して C a m P A L を発現させた。

【 0 0 9 0 】

( 2 ) p E T 2 8 a - L i e P A L の構築及び大腸菌への導入

ムラサキ ( *Lithospermum erythrorhizon* ) 由来の酵素である L i e P A L を、公知のポリヌクレオチド合成法により人工合成した。得られた L i e P A L を、前記 C a m P A L の制限処理に用いたものと同じ制限酵素を用いて制限処理した。以下、制限処理した L i e P A L を用いた以外は、前記の p E T 2 8 a - C a m P A L の作製手順と同様の方法で前記制限処理 p E T 2 8 a と連結し、 p E T 2 8 a - L i e P A L を作製した。以下、上記同様の方法により大腸菌株 B L 2 1 ( D E 3 ) に導入した。得られた L i e P A L 産生大腸菌株を培養して L i e P A L を発現させた。

10

【 0 0 9 1 】

( 3 ) p E T 2 8 a - R g P A L の構築及び大腸菌への導入

ロドトルラ・グルチニス ( *Rhodotorula glutinis* ) J N - 1 由来の酵素である R g P A L を、公知のポリヌクレオチド合成法により人工合成した。得られた R g P A L を、前記 C a m P A L の制限処理に用いたものと同じ制限酵素により制限処理した。以下、制限処理した R g P A L を用いた以外は、前記の p E T 2 8 a - C a m P A L の作製手順と同様の方法で、前記制限処理 p E T 2 8 a と連結し、 p E T 2 8 a - R g P A L を作製した。得られた p E T 2 8 a - R g P A L を、ヒートショックトランスフォーメーション法により大腸菌株 B L 2 1 ( D E 3 ) に導入した。得られた R g P A L 産生大腸菌株を培養して R g P A L を発現させた。

20

【 0 0 9 2 】

2 . 精製 C a m P A L 、 L i e P A L 、 及び R g P A L の酵素活性の評価

前記の C a m P A L 、 L i e P A L 、 及び R g P A L 産生大腸菌株をそれぞれ、 3 0 m g / L カナマイシン硫酸塩を含む L B 培地 5 m L に植菌し、 2 8 ° C で 1 6 時間培養した ( 以下、前培養ということがある ) 。その後、これを同培地 2 0 0 m L に植菌し、 O . D 6 0 0 が 0 . 6 になるまで培養後、イソプロピル - β - チオガラクトピラノシド ( Isopropyl β - D - 1 thiogalactopyranoside : I P T G ) を終濃度 0 . 5 m M となるように添加し、さらに 3 0 ° C において 2 0 時間培養した。これらの培養の際の回転数は 1 2 0 r p m とした。培養した菌体を集菌し、 0 . 5 M N a C l を含む 2 0 m M T r i s - H C l バッファ ( p H = 7 . 5 ) に懸濁し、超音波破碎を行なった。引き続き遠心分離の後に、その上清を H i s - T r a p カラムを用いて精製し、得られた酵素を活性測定に用いた。

30

【 0 0 9 3 】

酵素活性は、吸光度計を用いて反応生成物の吸収波長の吸光度を 1 0 分間測定することによって測定し定量した。具体的に、フェニルアラニンに対する脱アンモニア酵素活性については、 0 . 3 から 9 . 6 m M のフェニルアラニンを含む 5 0 m M T r i s - H C l バッファ ( p H = 8 . 6 ) に前記の各酵素を 2 m g / m L 加えて反応させ、桂皮酸の生成に由来する 3 0 5 n m の波長の吸光度の変化を 1 0 分間測定した。 4 - ニトロフェニルアラニンに対する脱アンモニア酵素活性については、 0 . 3 から 9 . 6 m M の 4 - ニトロフェニルアラニンを含む 5 0 m M T r i s - H C l バッファ ( p H = 8 . 6 ) に前記の各酵素を 2 m g / m L 加えて反応させ、 4 - ニトロ桂皮酸の生成に由来する 3 8 0 n m の波長の吸光度を 1 0 分間測定して定量した。

40

【 0 0 9 4 】

図 1 は、大腸菌での組換産生後に精製した C a m P A L 、 L i e P A L 、 及び R g P A L のフェニルアラニン ( P h e ) 及び 4 - ニトロフェニルアラニン ( n - P h e ) に対する脱アンモニア酵素比活性、  $K_m$ 、  $K_{cat}$ 、 及び  $K_m / K_{cat}$  を示す表である。 C a m P A L 、 L i e P A L 、 及び R g P A L の何れも、 4 - ニトロフェニルアラニンから 4 - ニトロ桂皮酸への変換活性を有することが分かる。

【 0 0 9 5 】

3 . C a m P A L 、 L i e P A L 、 及び R g P A L の休止菌体反応による酵素活性の評価

50

前記のCamPAL、LiePAL、及びRgPAL産生大腸菌株をそれぞれ、40 mg/Lカナマイシン硫酸塩を含む3 mLのLB培地を用い、300 rpmの撹拌、28の条件において16時間前培養した。この前培養液1 mLを40 mg/Lのカナマイシン硫酸塩を含む100 mLのLB培地に植菌し、120 rpmで振盪しながら30で4時間培養した後、0.5 mMのIPTGを添加して、更に20時間培養した。得られた菌体を反応バッファー(100 mM Tris-HClバッファー、pH 8.5)で2回洗浄した。

#### 【0096】

得られた休止菌体を、反応バッファーに懸濁し、300 rpmで振盪しながら28で反応させた。24時間毎に培地に20 mMの4-ニトロフェニルアラニンを追加し、連続して反応させた。定期的に反応上清を採取し、4-ニトロフェニルアラニン及び4-ニトロ桂皮酸の定量を行った。

10

#### 【0097】

上清を遠心管に写し、遠心分離によって回収し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて反応生成物を定量した。

また、対照として宿主大腸菌を用い、同様の実験を行った。

#### 【0098】

図2は、CamPAL、LiePAL、及びRgPAL産生大腸菌株の休止菌体反応による24時間後の反応上清中の4-ニトロ桂皮酸量を示すグラフである。CamPAL、LiePAL、及びRgPAL産生大腸菌株の何れの休止菌体を用いた場合でも、対照の大腸菌と比べて反応上清中の4-ニトロ桂皮酸量が顕著に上昇しており、CamPAL、LiePAL、及びRgPALによる4-ニトロフェニルアラニンから4-ニトロ桂皮酸への変換が進行したことが分かる。

20

#### 【0099】

図3は、CamPAL産生大腸菌株の休止菌体反応による反応上清中の4-ニトロフェニルアラニン量及び4-ニトロ桂皮酸量の経時変化を示すグラフである。反応上清中の4-ニトロフェニルアラニン量は24時間毎に添加に伴い増加するものの、その後は次回添加まで徐々に減少すると共に、反応上清中の4-ニトロ桂皮酸は継続的に増加していることが分かる。ここから、CamPALによる4-ニトロフェニルアラニンから4-ニトロ桂皮酸への変換が継続的に進行したことが分かる。

30

#### 【0100】

### [II. 4-ニトロ桂皮酸から4-アミノ桂皮酸への変換]

#### 1. プラスミドの構築及び大腸菌への導入

##### (1) pRSFDuet-1-scfRm2の構築及び大腸菌への導入

サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)由来の酵素であるscfRm2(アミノ酸配列を配列番号7、塩基配列の例を配列番号8にそれぞれ示す。)を、サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)のゲノムライブラリーから、プライマー5'-AACGGATCCGATGTCCCAACTGGAAAC-3'(配列番号17)及び5'-GCCAAGCTTTCAGTGATAAACGTTGATTACG-3'(配列番号18)を用いてPCRにより増幅した後、制限酵素BamHI及びHindIIIにより制限処理し、同じく制限酵素BamHI及びHindIIIにより制限処理したプラスミドpRSFDuet-1(Novagen)に対して、DNAライゲーションキットLigation High Ver.2(東洋紡社製)を用いて連結し、pRSFDuet-1-scfRm2を作製した。得られたpRSFDuet-1-scfRm2を、ヒートショックトランスフォーメーション法により大腸菌株BL21(DE3)に導入した。得られたscfRm2産生大腸菌株を培養してscfRm2を発現させた。

40

#### 【0101】

##### (2) pRSFDuet-1-scHbn1の構築及び大腸菌への導入

サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)由来の酵素であるscHbn1(アミノ酸配列を配列番号9、塩基配列の例を配列番号10にそれぞれ示す。)を、

50

サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) のゲノムライブラリーから、プライマー 5' - AACGGATCCGATGTCCTGCTGTTGCAAC - 3' (配列番号 19) 及び 5' - GCCAAGCTTAATTGAAGATTTCAACATCG - 3' (配列番号 20) を用いて PCR により増幅した後、前記 *scFrm2* の制限酵素処理と同じ制限酵素処理及びプラスミドへの連結を行い、*pRSFDuet-1-schbn1* を作製した。得られた *pRSFDuet-1-schbn1* を、ヒートショックトランスフォーメーション法により大腸菌株 BL21 (DE3) に導入した。得られた *schbn1* 産生大腸菌株を培養して *schbn1* を発現させた。

【0102】

(3) *pRSFDuet-1-cdFLDZ* の構築及び大腸菌への導入

クロストリジウム・ディフィシレ (*Clostridium difficile*) 由来の酵素である *cdFLDZ* (アミノ酸配列を配列番号 11、塩基配列の例を配列番号 12 にそれぞれ示す。) を、クロストリジウム・ディフィシレ (*Clostridium difficile*) のゲノムライブラリーから、プライマー 5' - CCGGGATCCAAATGAAGATTAGTTCTATG - 3' (配列番号 21) 及び 5' - CCGGAATTCTTATATATTTAATGCTAC - 3' (配列番号 22) を用いて PCR により増幅した後、前記 *scFrm2* の制限酵素処理と同じ制限酵素処理及びプラスミドへの連結を行い、*pRSFDuet-1-cdFLDZ* を作製した。得られた *pRSFDuet-1-cdFLDZ* を、ヒートショックトランスフォーメーション法により大腸菌株 BL21 (DE3) に導入した。得られた *cdFLDZ* 産生大腸菌株を培養して *cdFLDZ* を発現させた。

【0103】

2. *scFrm2*、*schbn1*、及び *cdFLDZ* の休止菌体反応による酵素活性の評価

前記の *scFrm2*、*schbn1*、及び *cdFLDZ* 産生大腸菌株をそれぞれ、30 mg/L カナマイシン硫酸塩を含む 3 mL の LB 培地を用い、300 rpm で振盪しながら 28 °C で 16 時間前培養した。この前培養液 1 mL を 30 mg/L カナマイシン硫酸塩を含む 100 mL の LB 培地に植菌し、120 rpm で振盪しながら 30 °C で 4 時間培養した後、0.1 mM の IPTG を添加して、更に 20 °C で 12 時間培養した。得られた菌体を反応バッファー (100 mM リン酸二水素カリウム ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )、1 mM 硫酸マグネシウム ( $\text{MgSO}_4$ )、0.5 mM 塩化チアミン、pH 7.0) で 2 回洗浄した。

【0104】

得られた休止菌体を、2.5 mM の 4 - ニトロ桂皮酸を含む反応バッファーに懸濁し、300 rpm で振盪しながら 30 °C で 12 時間反応させた。反応後、反応上清を採取し、4 - アミノ桂皮酸の定量を行った。上清を遠心管に写し、遠心分離によって回収し、前記 HPLC を用いて反応生成物を定量した。

また、対照として宿主大腸菌を用い、同様の実験を行った。

【0105】

図 4 は、大腸菌での組換産生後に休止菌体反応に供した *scFrm2*、*schbn1*、及び *cdFLDZ* による 4 - ニトロ桂皮酸から 4 - アミノ桂皮酸への変換活性を示すグラフを図 4 に示す。*scFrm2*、*schbn1*、及び *cdFLDZ* 産生大腸菌株の何れの休止菌体を用いた場合でも、対照の大腸菌と比べて培地上清中の 4 - アミノ桂皮酸量が顕著に上昇しており、*scFrm2*、*schbn1*、及び *cdFLDZ* による 4 - ニトロ桂皮酸から 4 - アミノ桂皮酸への変換が進行したことが分かる。また、対照の大腸菌は 4 - アミノ桂皮酸を生産していた。この結果より、大腸菌は 4 - ニトロ桂皮酸から 4 - アミノ桂皮酸への還元反応を生じさせる能力を有していることが証明された。

【0106】

〔実施例 2〕

〔Ⅲ. 4 - ニトロフェニルアラニンから 4 - ニトロ桂皮酸への変換〕

1. *CamPAL* の菌体量と基質量の違いによる変換効率の評価

実施例 1 に記載の *CamPAL* 産生大腸菌株を、40 mg/L カナマイシン硫酸塩を含

10

20

30

40

50

む5 mLのLB培地を用い、攪拌速度300 rpmの攪拌、28 °Cの条件において16時間前培養した。この前培養液1 mLを、以下の組成を有する100 mLのTB培地に、80 mg/Lカナマイシン硫酸塩を加えた後に植菌し、120 rpmで振盪しながら30 °Cで4時間培養した後、0.1 mMのIPTGを添加して、更に20時間培養した。遠心分離によって培養液から菌体を回収した後、-80 °Cで保存した。得られた凍結菌体を10 g/L、20 g/L及び30 g/Lに計量した。さらに、基質である4-ニトロフェニルアラニンに4.2 g/L、21 g/L、42 g/Lを計量した。

【0107】

【表2】

TB培地 (pH7.0)	
トリプトン	12g/L
イーストエクストラクト	24 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.31g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12.54 g/L
グリセロール	8 mL

【0108】

それぞれの菌体と基質を反応バッファー(100 mM Tris-HClバッファー、pH 8.5)に懸濁し、300 rpmの攪拌、37 °Cの条件において休止菌体反応させた。24時間反応後の反応液を採取し、4-ニトロフェニルアラニン及び4-ニトロ桂皮酸の定量を行った。それぞれの反応生成物の定量は、得られた(菌体)反応液の上清を遠心管に移し、遠心分離によって回収し、前記HPLCを用いて反応生成物を定量した。

20

【0109】

図5は、それぞれの菌体量と基質量を反応バッファーに懸濁し、24時間反応させた結果を示した。この結果から、菌体量20 g/L及び30 g/L、且つ、基質量21 g/Lの場合に、収率が60%以上と高い4-ニトロフェニルアラニンから4-ニトロ桂皮酸への変換効率を示した。

【0110】

#### 2.4-ニトロフェニルアラニンの4-ニトロ桂皮酸への変換反応

30

2 Lジャーファーマンター(丸菱バイオエンジニアリング社製:BNR-C-2LS)を反応器とし、実施例1に記載のCamPAL産生大腸菌株(菌体量20 g/L~30 g/L)を用いて、基質である4-ニトロフェニルアラニン(基質量21 g/L)を4-ニトロ桂皮酸へと変換する反応を行った。

【0111】

具体的には、前記CamPAL産生大腸菌株を、15 mLのLB培地に40 mg/Lカナマイシン硫酸塩を添加して用い、300 rpmで攪拌しながら、28 °Cで16時間前培養した。この前培養液12 mLを、80 mg/Lカナマイシン硫酸塩を加えた1.2 LのTB培地を含む2 Lジャーファーマンターに植菌し、通気量3.5 L/分、攪拌速度500 rpm、30 °Cの条件において4時間培養した。引き続き、この培養液に0.1 mMのIPTGを添加して、更に20時間培養した。培養液のOD<sub>600</sub>の値から菌体量を計算したところ、30 g/Lであった。

40

【0112】

培養終了後、培養液に基質である21 g/Lの4-ニトロフェニルアラニンを添加した後、2 N NaOH水溶液を用いてpH 8.5に調整した。通気をすることなくこの培養液を500 rpmの攪拌、37 °Cの条件において24時間反応させた。反応中の反応液を採取し、以下の方法で4-ニトロフェニルアラニン及び4-ニトロ桂皮酸を定量した。即ち、反応液を遠心管に移し、遠心分離によって上清を回収し、前記条件のHPLCを用いて反応生成物を定量した。

## 【0113】

図6は、24時間反応させた後の反応液の分析結果を示すグラフである。この結果から、21g/Lの4-ニトロフェニルアラニンから18g/Lの4-ニトロ桂皮酸へと、高い変換効率で変換されたことが示された。また、通気量を0.04L/分に変更して同様の反応を24時間行った結果、21g/Lの4-ニトロフェニルアラニンから12g/Lの4-ニトロ桂皮酸へと、高い変換効率で変換されたことが示された。

## 【0114】

CAMPAL産生大腸菌の1.2L反応液から4-ニトロ桂皮酸の精製を行った。24時間反応させた後、遠心分離によって菌体を除き、反応液上清に12N HClを加えてpH5に調整することで析出物を得た。析出物を濾過にて回収後、アセトンで洗浄して乾燥させた。乾燥後に回収した固体生成物を、前記条件のHPLC分析に供した。

10

## 【0115】

図7は、得られた生成物のHPLC分析結果を示すグラフである。この結果によれば、生成物は4-ニトロ桂皮酸であり、4-ニトロフェニルアラニンから4-ニトロ桂皮酸への変換反応が生じたことが示された。また、得られた4-ニトロ桂皮酸の純度は97%、収率は93%と、極めて高純度且つ高収率であることが分かった。特に、得られた4-ニトロ桂皮酸の純度は、化学的な還元的手法によって4-アミノ桂皮酸に変換するのに十分な純度である。

## 【0116】

## 〔実施例3〕

20

## 〔IV. 4-ニトロフェニルアラニンから4-アミノ桂皮酸への変換反応〕

## 1. 4-ニトロ桂皮酸の4-アミノ桂皮酸への変換に適した炭素源の探索

大腸菌はニトロレダクターゼ(nfsA及びnfsB)を有していることが知られている。そこで、大腸菌を用いて4-ニトロ桂皮酸から4-アミノ桂皮酸への還元反応を行った。

## 【0117】

まず、実施例1に記載のCAMPAL産生大腸菌株を、実施例2と同様の方法によって16時間前培養した。この前培養液1mLを、80mg/Lカナマイシン硫酸塩を加えた100mLのTB培地に植菌し、120rpmの攪拌、30の条件において4時間培養した後、0.1mMのIPTGを添加して、更に16時間培養した。得られた培養液に2g/Lの4-ニトロ桂皮酸を添加し、2N NaOHを用いてpH8に調整後、炭素源としてグルコース、フルクトース及びグリセロールを終濃度10%となるように添加して、300rpmの攪拌、37の条件において培養し、24時間反応させた。

30

## 【0118】

反応中の反応液を採取し、4-アミノ桂皮酸の定量を行った。即ち、反応液を遠心管に移し、遠心分離によって上清を回収し、前記HPLCを用いて反応生成物を定量した。

## 【0119】

図8は、CAMPAL産生大腸菌の培養液にグルコース、フルクトース及びグリセロールを終濃度10%添加した際の4-ニトロ桂皮酸から4-アミノ桂皮酸への変換反応を示すグラフである。この結果より、グリセロールを添加した場合に最も多くの4-アミノ桂皮酸が得られることが示された。また、この4-ニトロ桂皮酸から4-アミノ桂皮酸への変換反応の際に添加する炭素源としては、グリセロールが適していることが分かった。

40

## 【0120】

## 2. 4-ニトロフェニルアラニンの4-アミノ桂皮酸の変換

1Lジャーファーマンター(Biot社製:BMJ-01)を用いて、上記のグリセロールを添加した条件下で、4-ニトロフェニルアラニンから4-アミノ桂皮酸への変換を行った。実施例2の前培養液5mLを、80mg/Lカナマイシン硫酸塩を加えた0.5LのTB培地を含む1Lジャーファーマンターに植菌し、通気量を0.7L/分、645rpmの攪拌、30の条件において4時間培養した後、0.1mMのIPTGを添加して、更に20時間培養した。

50

## 【0121】

培養終了後、培養液に7 g / Lの4 - ニトロフェニルアラニン及び終濃度10%のグリセロールを添加した後、2 N NaOHを用いてpH 8.5に調整した。0.02 L / 分の通気量、645 rpmの攪拌及び37 °Cの条件において36時間反応させた。pHは8.0より低くなった場合は、2 N NaOHを添加した。反応中の反応液を採取し、4 - ニトロフェニルアラニン、4 - ニトロ桂皮酸及び4 - アミノ桂皮酸の定量を行った。

## 【0122】

図9は、CamPAL産生大腸菌による4 - ニトロフェニルアラニンの4 - アミノ桂皮酸への変換活性を示すグラフである。この結果より、7 g / Lの4 - ニトロフェニルアラニンを原料として4.7 g / Lの4 - アミノ桂皮酸を生産できることが示された。

10

## 【0123】

0.5 Lの反応液から4 - アミノ桂皮酸の精製を行った。24時間反応させた反応液から、遠心分離によって菌体を除き、得られた上清に12 N HClを加えてpH 3に調整し、600 mLの反応液上清に強酸性陽イオン交換樹脂(三菱ケミカル社製:ダイヤイオンPK212LH)を700 g添加して、1時間攪拌した。樹脂を回収して、樹脂量の2倍量の蒸留水で洗浄し、さらに樹脂量の2倍量のエタノールで洗浄した。樹脂量の1.5倍量の7.5%アンモニア水を加えて4 - アミノ桂皮酸を溶出させた。さらに、0.5倍量の7.5%アンモニア水を加えて樹脂をリンス後、4 - アミノ桂皮酸を含む溶出液を得た。溶出液をエバポレーターで濃縮後、12 N HClを用いてpH 3に調整した。その後、等量の酢酸エチルを添加して1時間攪拌させ、遠心分離によって酢酸エチル層を回収した。エバポレーターを用いて酢酸エチルを除去し、4 - アミノ桂皮酸の粗精製物を回収した。

20

## 【0124】

4 - アミノ桂皮酸の粗精製物をアセトンに溶解後、濾過で不溶解物質を除き、12 N HClを加えて4 - アミノ桂皮酸の塩酸塩を析出させた。これを濾過にて回収後、アセトンを用いて洗浄・乾燥させて固体乾燥物を得た。乾燥後に回収した固体生成物を、前記条件のHPLC分析に供した。

## 【0125】

図10は、得られた生成物及び4 - アミノ桂皮酸(標品)のHPLC分析の結果を示すグラフである。この結果によれば、生成物は4 - アミノ桂皮酸であり、大腸菌のニトロレダクターゼ(還元反応)を利用した4 - ニトロフェニルアラニンから4 - アミノ桂皮酸への変換反応が生じたことが示された。また、得られた4 - アミノ桂皮酸の純度は98%と、極めて高純度であることが分かった。4 - アミノ桂皮酸の回収率は60%であった。

30

## 【0126】

## 〔実施例4〕

## 〔4 - ニトロ桂皮酸から4 - アミノ桂皮酸への変換〕

## 1. プラスミドの構築及び大腸菌への導入

## (1) pCDF Duet - 1 - nfsAの構築及び大腸菌への導入

大腸菌(Escherichia coli)由来の酵素であるnfsA(アミノ酸配列を配列番号13、塩基配列の例を配列番号14にそれぞれ示す。)を、大腸菌(Escherichia coli)のゲノムライブラリーから、プライマー5' - CAGACCATGGGCACGCCAACCAATTGAACCTTATTTGTG - 3' (配列番号23)及び5' - GAGGATCCCTTAGCGCGTTCGCCCAACCCCTG - 3' (配列番号24)を用いてPCRにより増幅した後、制限酵素NcoI及びBamHIにより制限処理し、同じく制限酵素NcoI及びBamHIにより制限処理したプラスミドpCDF Duet - 1(Novagen)に対して、DNAライゲーションキットLigation High Ver.2(東洋紡社製)を用いて連結し、pCDF Duet - 1 - nfsAを作製した。得られたpCDF Duet - 1 - nfsAを、ヒートショックトランスフォーメーション法により大腸菌株BL21(DE3)に導入した。得られたnfsA産生大腸菌株を培養してnfsAを発現させた。

40

## 【0127】

50

## (2) pCDF Duet - 1 - n f s Bの構築及び大腸菌への導入

大腸菌 (*Escherichia coli*) 由来の酵素である n f s B (アミノ酸配列を配列番号 15、塩基配列の例を配列番号 16 にそれぞれ示す。) を、大腸菌 (*Escherichia coli*) のゲノムライブラリーから、プライマー 5' - C A G A C C A T G G G C G A T A T C A T T T C T G T C G C C - 3' (配列番号 25) 及び 5' - G A G G A T C C T T A C A C T T C G G T T A A G G T G A T G - 3' (配列番号 26) を用いて PCR により増幅した後、前記 n f s A の制限酵素処理と同じ制限酵素処理及びプラスミドへの連結を行い、p C D F D u e t - 1 - n f s A を作製した。得られた p C D F D u e t - 1 - n f s B を、ヒートショックトランスフォーメーション法により大腸菌株 B L 2 1 ( D E 3 ) に導入した。得られた n f s B 産生大腸菌株を培養して n f s B を発現させた。

10

【0128】

### 2. n f s A、及び n f s B の休止菌体反応による酵素活性の評価

前記の n f s A 及び n f s B 産生大腸菌株をそれぞれ、40 mg / L のストレプトマイシン硫酸塩を含む 5 mL の LB 培地を用い、300 rpm で振盪しながら 28 °C で 16 時間前培養した。この前培養液 1 mL を、80 mg / L ストレプトマイシン硫酸塩を含む 100 mL の TB 培地に植菌し、120 rpm で振盪しながら 30 °C で 4 時間培養した後、0.1 mM の IPTG を添加して、更に 30 °C で 18 時間培養した。

【0129】

得られた菌体を含む培養液に 2 N N a O H を加えて pH 8.0 に調整し、この培養液に 2 g / L の 4 - ニトロ桂皮酸及び終濃度 2 % のグリセロールを懸濁し、120 rpm で振盪しながら 37 °C で 18 時間反応させた。反応後、反応液上清を採取し、4 - アミノ桂皮酸の定量を行った。上清を遠心管に写し、遠心分離によって回収し、前記 H P L C を用いて反応生成物を定量した。

20

また、対照として宿主大腸菌を用い、同様の実験を行った。

【0130】

結果より、n f s A 産生大腸菌株は 0.26 g / L の 4 - アミノ桂皮酸に変換し、n f s B 産生大腸菌株は 0.76 g / L の 4 - アミノ桂皮酸に変換し、対照の大腸菌株は 0.32 g / L の 4 - アミノ桂皮酸に変換した。n f s A 及び n f s B による 4 - ニトロ桂皮酸から 4 - アミノ桂皮酸への変換が進行したことが分かる。

【産業上の利用可能性】

30

【0131】

本発明は、バイオマス等のグルコースからの 4 - アミノ桂皮酸の合成が求められる分野において広く利用でき、産業上の有用性は高い。

【 図 1 】

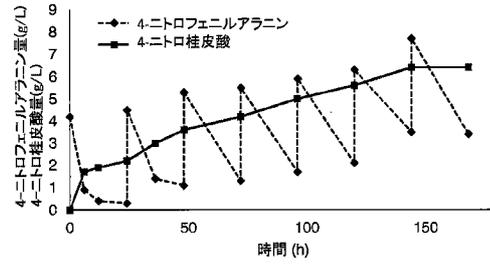
図1

酵素	基質*	比活性 mmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup>	Km mM <sup>-1</sup>	Kcat S <sup>-1</sup>	Kcat / Km S <sup>-1</sup> mM
RgPAL	Phe	0.96	1.29±0.17	22.85	17.71
	n-Phe	0.09	>4.3	N.D.	N.D.
CamPAL	Phe	1.43	0.11±0.03	14.97	136.07
	n-Phe	1.14	0.62±0.11	23.81	38.40
LiePAL	Phe	1.08	0.11±0.02	4.88	44.35
	N-Phe	0.40	2.69±0.27	24.93	9.27

\*Phe: フェニルアラニン、n-Phe: 4-ニトロフェニルアラニン

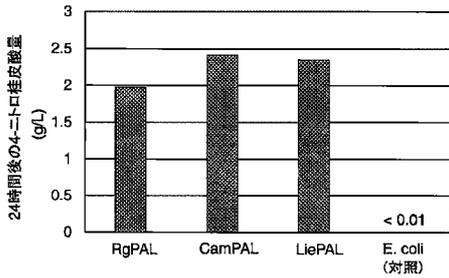
【 図 3 】

図3



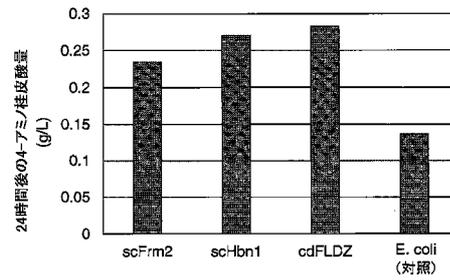
【 図 2 】

図2



【 図 4 】

図4



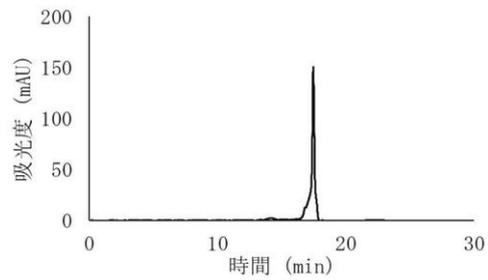
【 図 5 】

図5

菌体量 (g/L)	4-ニトロフェニルアラニン (g/L)	4-ニトロ桂皮酸 (g/L)	収率 (%)
10	4.2	3.8±0.7	91
	21	10.7±1.4	51
	42	10.9±0.7	26
20	4.2	2.9±0.5	68
	21	14.3±1.4	68
	42	19.0±1.4	45
30	4.2	2.7±0.3	63
	21	12.6±1.2	60
	42	17.3±0.8	41

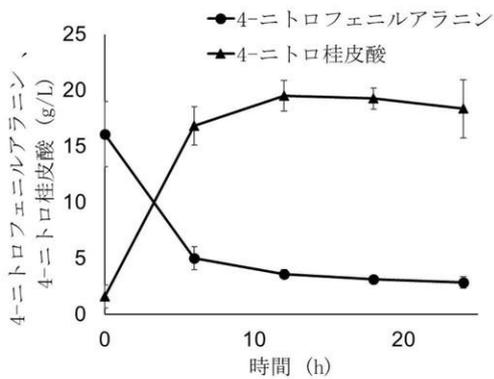
【 図 7 】

図7



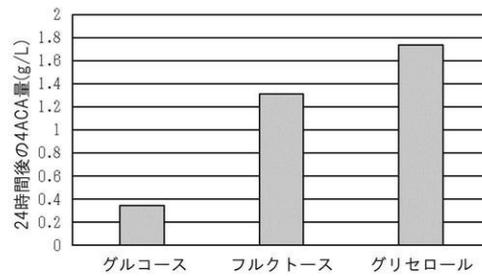
【 図 6 】

図6



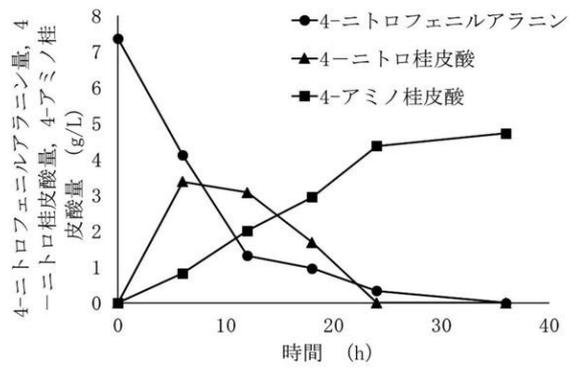
【 図 8 】

図8



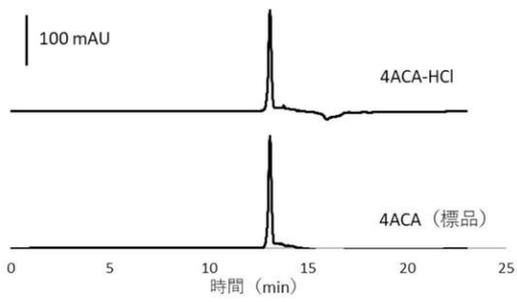
【 図 9 】

図9



【 図 1 0 】

図10



【 配 列 表 】

0007228914000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
C 1 2 N 9/00 (2006.01) C 1 2 N 9/00

- (72)発明者 高谷 直樹  
茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立大学法人筑波大学内
- (72)発明者 榎尾 俊介  
茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立大学法人筑波大学内
- (72)発明者 川 崎 志慧  
茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立大学法人筑波大学内
- (72)発明者 皆川 一  
茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立大学法人筑波大学内

審査官 福澤 洋光

## (56)参考文献 国際公開第2015/119251(WO, A1)

RecName: Full=Phenylalanine ammonia lyase. , Database DDBJ/EMBL/GenBank [online] , Accession No. P45726 , 2018年01月31日 , <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/1171998?sat=47&atkey=13492906>

RecName: Full=Phenylalanine ammonia lyase 2; Short=PAL 2. , Database DDBJ/EMBL/GenBank [online] , Accession No. 049836 , 2018年01月31日 , <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/3914262?sat=47&satkey=13492863>

Frm2p [*Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113 7D]. , Database DDBJ/EMBL/GenBank [online] , Accession No. EIW11857 , 2015年03月18日 , <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/EIW11857>

RecName: Full=Putative nitroreductase HBN1; AltName: Full=Homologous to bacterial nitro reductases pro , Database DDBJ/EMBL/GenBank [online] , Accession No. Q96VH4 , 2018年01月31日 , <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/74644560?sat=46&satkey=145043964>

NADH oxidase [*Clostridioides difficile*]. , Database DDBJ/EMBL/GenBank [online] , Accession No. PBG29660 , 2017年09月14日 , <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/PBG29660>

RecName: Full=Oxygen insensitive NADPH nitroreductase; AltName: Full=Modulator of drug activity A. , Database DDBJ/EMBL/GenBank [online] , Accession No. P17117 , 2018年01月31日 , <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/730007?sat=46&satkey=145009368>

RecName: Full=Oxygen insensitive NAD(P)H nitroreductase; AltName: Full=Dihydropteridine reductase; A , Database DDBJ/EMBL/GenBank [online] , Accession No. P38489 , 2018年01月31日 , <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/585554?sat=46&satkey=145008969>

KAWASAKI, Y., et al. , Novel polycondensed biopolyamide generated from biomass derived 4 aminohydrocinnamic acid. , *Applied Microbiology and Biotechnology* , 2017年11月17日 , Vol.102 , p.631-639

## (58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 1 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 1 2 P 1 / 0 0 - 4 1 / 0 0

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

U n i P r o t / G e n e S e q

P u b M e d