

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012年11月1日(01.11.2012)



(10) 国際公開番号
WO 2012/147556 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12P 19/36 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/060293
- (22) 国際出願日: 2012年4月16日(16.04.2012)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2011-098670 2011年4月26日(26.04.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立
大学法人広島大学(Hiroshima University) [JP/JP]; 〒
7398511 広島県東広島市鏡山一丁目3番2号
Hiroshima (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 黒田 章夫
(KURODA, Akio). 廣田 隆一(HIROTA, Ryuichi).
- (74) 代理人: 特許業務法人原謙三国際特許事務所
(HARAKENZO WORLD PATENT & TRADEMARK); 〒
5300041 大阪府大阪市北区天神橋2丁目北2
番6号 大和南森町ビル Osaka (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS,
JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST,
SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,
MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシ
ア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨー
ロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告(条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))



WO 2012/147556 A1

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING PHOSPHITE DEHYDROGENASE PROTEIN AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の製造方法およびその利用

(57) Abstract: In order to provide a phosphite dehydrogenase protein simultaneously having an improvement in both the properties of solubility and heat stability, a gene that codes for the protein, a method for producing the protein, and a use thereof, a phosphite dehydrogenase protein having a specific amino acid sequence and a gene coding for the protein are used.

(57) 要約: 可溶性および熱安定性の両方の性質が同時に向上している亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質、当該タンパク質をコードする遺伝子、当該タンパク質の製造方法およびその利用を提供するために、特定のアミノ酸配列を有する亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質および当該タンパク質をコードする遺伝子を用いる。

明 細 書

発明の名称：

亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の製造方法およびその利用

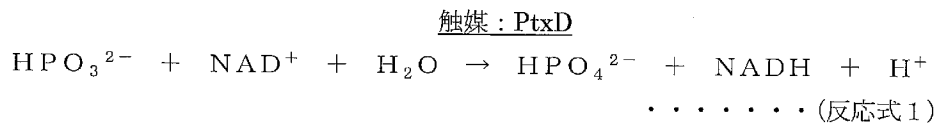
技術分野

[0001] 本発明は、亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の製造方法およびその利用に関する。更に具体的には、本発明は、亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の製造方法、NADHの製造方法、およびNADPHの製造方法に関する。

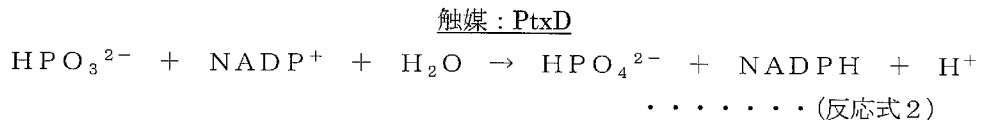
背景技術

[0002] 亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質 (PtxD) は、バクテリアの一部が有するタンパク質であり、NAD⁺依存的またはNADP⁺依存的に亜リン酸を酸化して、NADHまたはNADPHを生成する酵素である。以下に、NAD⁺依存的またはNADP⁺依存的に亜リン酸を酸化する場合の反応式を記載する。

[0003] [化1]



[0004] [化2]



[0005] 上記化学反応は、生体反応を利用した物質生産において非常に重要な補因子として機能するNADHまたはNADPHを効率よく生産することができるために注目されているが、これらの化学反応を工業的に利用するには至っていない。つまり、現状では、亜リン酸を用いてNADHまたはNADPHを工業的に大量に製造できる状況には至っていない（例えば、非特許文献1

および2参照)。従来から、NADHおよびNADPHの生産には、ギ酸デヒドロゲナーゼ、グルコースデヒドロゲナーゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼなども用いられてきた。しかしながら、これらの酵素は、反応性に富んだ基質を用いるので、その結果、反応系が不安定になるという問題点を有している。また、これらの酵素は、反応性に富んだ生成物が生じるので、その結果、反応系が不安定になるという問題点を有している。なお、反応系を不安定にする主な原因は、pHの変動である。一方、亜リン酸デヒドロゲナーゼは、基質および生成物が共に反応性が低いとともに、基質が安価であるという利点を有しているため、工業的に利用することが可能になれば、上述した酵素に代わって広く利用され得る可能性を有している。具体的に、亜リン酸デヒドロゲナーゼの場合には、亜リン酸およびリン酸の両方に緩衝作用があるために、反応系を安定化させることが可能である。

[0006] NADHおよびNADPHを工業的に大量に製造するためには、大量の亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質が必要である。それ故に、従来から、大腸菌などの宿主内で異種生物由来の野生型亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質を強制発現させた後に当該タンパク質を精製することによって大量の亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質を得ようとする試みがなされている。

[0007] しかしながら、当該技術では、野生型の亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質を大腸菌などで強制発現させたときに、亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の多くが水溶液に対して不溶性になり、回収不可能になる。それ故に、強制発現した場合にも水溶液に対して高い溶解性を示す亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質が求められている。

[0008] また、NADHおよびNADPHを工業的に大量に製造する場合には反応系の温度が上昇するので、熱安定性が高い亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質を用いる必要がある。しかしながら、従来の野生型の亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質は熱安定性が低い（具体的には、40℃で多くの酵素が失活する）。それ故に、高温条件下であっても高い活性を維持することが可能な亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質が求められている。

[0009] このような状況下において、上述した性質が改善された亜リン酸デヒドロゲナーゼの変異体をスクリーニングする試みがなされている。

[0010] 例えば、非特許文献3には、変異が導入された亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質を大腸菌内で強制発現することによって、可溶性画分に含まれる変異型の亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の量を増加させる技術が開示されている。なお、非特許文献3に記載されているデータからは、可溶性画分に含まれる変異型の亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の量が増加した理由が、当該タンパク質の溶解性が上昇したことによるのか、当該タンパク質の発現量が上昇したことによるのかは判断できない。また、非特許文献4および5には、熱安定性が高い変異型の亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質が開示されている。

先行技術文献

非特許文献

- [0011] 非特許文献1 : Angew. Chem. Int. Ed. 2002, 41, No.17, 3257-3259
非特許文献2 : The Journal of Biological Chemistry, Vol.276, No.20, Issue of May 18, 2001, 17429-17436
非特許文献3 : Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening, 2006, 9, 237-245
非特許文献4 : Biotechnology and Bioengineering, Vol.99, No.2, February 1, 2008, 268-274
非特許文献5 : Applied and Environmental Microbiology, Oct. 2005, 5728-5734

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0012] しかしながら、従来の変異型の亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質では、可溶性および熱安定性の両方の性質を同時に向上させることができなかった。

[0013] 本発明は、上記従来の問題点に鑑みなされたものであって、その目的は、可溶性および熱安定性の両方の性質が同時に向上している亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の製造方法およびその利用を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0014] タンパク質内のアミノ酸の変異がタンパク質の立体構造へ及ぼす影響は予測し難い。例えば、熱安定性に寄与する変異および可溶性に寄与する変異を1つのタンパク質内へ同時に導入した時に、熱安定性に寄与する変異によって可溶性に寄与する変異の効果が打ち消されたり、可溶性に寄与する変異によって熱安定性に寄与する変異の効果が打ち消されたり、各々の変異が互いの効果を打ち消しあったりする場合が多々ある。つまり、熱安定性に寄与する変異および可溶性に寄与する変異の両方を同時に1つのタンパク質内へ導入したとしても、熱安定性および可溶性の両方の性質が向上したタンパク質が得られるわけではない。

[0015] そこで、本発明者らは、独自のスクリーニング方法によって、安定性および可溶性の両方の性質が向上した亜リン酸デヒドロゲナーゼを自然界から単離することによって、本発明を完成させるに至った。

[0016] 本発明のタンパク質は、上記課題を解決するために、以下の(a)または(b)に記載のタンパク質である。つまり、
(a) 配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質。
(b) 配列番号1のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸からなり、かつ、亜リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質。

[0017] 上記構成によれば、熱安定性および可溶性の両方の性質が向上したタンパク質を容易に利用することができる。

発明の効果

[0018] 本発明は、水溶液に対する可溶性が高い亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質を大量に入手することができるという効果を奏する。

[0019] 本発明は、耐熱性の高い亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質を大量に入

手することができるという効果を奏する。

[0020] 本発明は、各種阻害物質によって活性を阻害されることがない亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質を大量に入手することができるという効果を奏する。

[0021] 本発明は、従来の亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質よりも反応効率が高い亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質を大量に入手することができるという効果を奏する。

図面の簡単な説明

[0022] [図1]本発明の実施例にてスクリーニングされた菌の系統樹である。

[図2]本発明の亜リン酸デヒドロナーゼタンパク質を大腸菌内で強制発現させた場合の、亜リン酸デヒドロナーゼタンパク質の所在を示すSDS-PAGEの写真である。

[図3]本発明の亜リン酸デヒドロナーゼタンパク質の耐熱性を示すグラフである。

[図4]本発明の亜リン酸デヒドロナーゼタンパク質の活性に及ぼす各種阻害剤の効果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0023] 本発明の一実施形態について以下に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。なお、本明細書において「A～B」との記載は、「A以上B以下」を意図する。

[0024] [1. タンパク質および遺伝子]

本実施の形態のタンパク質（亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質）は、以下の（a）または（b）に記載のタンパク質である。つまり、

（a）配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質、

（b）配列番号1のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸からなり、かつ、亜リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質。

[0025] 「1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸」

の詳細については、後述する。

[0026] 本実施の形態のタンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列と、85.0%以上、より好ましくは90.0%以上、より好ましくは95.0%以上、より好ましくは98.0%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、亜リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質であってもよい。

[0027] 本実施の形態のタンパク質は、水溶液に対する可溶性が高いとともに、耐熱性が高いという極めて優れた性質を有するタンパク質である。

[0028] 本実施の形態の遺伝子は、上記(a)または(b)に記載のタンパク質をコードする遺伝子である。本実施の形態の遺伝子は上記タンパク質をコードしていればよく、如何なるコドンの組み合わせによって形成された遺伝子であってもよい。

[0029] 更に具体的には、本実施の形態の遺伝子は、以下の(c)または(d)のDNAからなる遺伝子であり得る。つまり、

(c) 配列番号2の塩基配列からなるDNA、

(d) 配列番号2の塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ、亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質をコードするDNA。

[0030] 「ストリンジエントな条件」の詳細については、後述する。

[0031] [2. 亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の製造方法]

本実施形態の亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の製造方法は、以下の(a)または(b)のタンパク質を宿主内で発現させる工程と、上記宿主内で発現させたタンパク質を溶液中に可溶化させる工程と、を有する製造方法である。つまり、

(a) 配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号1のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸からなり、かつ、亜リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質。

[0032] まず、(a)または(b)のタンパク質を宿主内で発現させる工程につい

て説明する。

[0033] 上述した配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質とは、本発明者がスクリーニングして入手した亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質である（実施例参照）。

[0034] 宿主内で発現されるタンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸からなり、かつ、亜リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質であってもよい。このとき、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加される部位は特に限定されず、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された後のタンパク質が亜リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有していれば、タンパク質中のどの部位であってもよい。ここで「1若しくは数個のアミノ酸」が意図するアミノ酸の数は特に限定されないが、10個以内のアミノ酸であることが好ましく、8個以内のアミノ酸であることが更に好ましく、6個以内のアミノ酸であることが最も好ましい。

[0035] 宿主内で発現されるタンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列と、85.0%以上、より好ましくは90.0%以上、より好ましくは95.0%以上、より好ましくは98.0%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、亜リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質であってもよい。

[0036] なお、アミノ酸配列の相同性は、公知の方法で求めることができる。具体的には、GENETYX-WIN（株式会社ゼネティックス社製）を、GENETYX-WINのマニュアルに従って使用し、配列番号1に示すアミノ酸配列と比較対象のアミノ酸配列とのホモロジーサーチ（homology search）により、一致するアミノ酸配列の割合（%）として相同性を計算することができる。

[0037] 宿主内で発現されるタンパク質は、上述したタンパク質と、他のタンパク質またはタグとの融合タンパク質であってもよい。上記他のタンパク質およびタグとしては特に限定されず、所望のタンパク質（例えば、GSTタンパク質など）またはタグ（例えば、Hisタグ、HAタグ、Flagタグなど）

)を用いることが可能である。

[0038] 上述したように、本実施形態の亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の製造方法は、上述したタンパク質を宿主内で発現させる工程を有している。

[0039] 上記宿主としては特に限定されず、適宜、所望の宿主を用いることが可能である。例えば、大腸菌（例えば、*Escherichia coli*など）等の細菌、酵母（例えば、出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*、分裂酵母*Schizosaccharomyces pombe*など）、昆虫細胞、線虫（例えば、*Caenorhabditis elegans*など）、アフリカツメガエル（例えば、*Xenopus laevis*など）の卵母細胞、哺乳類細胞（例えば、CHO細胞、COS細胞、およびBows黒色腫細胞）や各種ヒト培養細胞などを用いることが可能であるが、これらに限定されない。

[0040] 上記発現させる工程は、(a)または(b)のタンパク質を宿主内で発現させ得る工程であればよく、その具体的な構成は特に限定されない。例えば、上記発現させる工程は、(a)または(b)のタンパク質をコードする塩基配列からなるDNAを含むベクターを宿主へ導入する工程を包含し得る。当該DNAの具体的な塩基配列は特に限定されず、タンパク質中の各アミノ酸に対して、様々なコドン配列を用いることが可能である。当該DNAは、例えば、以下の(c)または(d)のDNAであり得る。つまり、

(c) 配列番号2の塩基配列からなるDNA。

(d) 配列番号2の塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列とストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズし、かつ、亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質をコードするDNA。

[0041] 上述した配列番号2の塩基配列からなるDNAとは、本発明者がスクリーニングして入手した亜リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子であって、上述した配列番号1のアミノ酸からなるタンパク質をコードしているDNAである。

[0042] 上記ベクターに含まれるDNAは、配列番号2の塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列とストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズし、かつ

、亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質をコードするDNAであってもよい。

[0043] 本明細書中で使用される場合、用語「ストリンジェントな条件」は、ハイブリダイゼーション溶液（50%ホルムアミド、5×SSC（150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム）、50mMのリン酸ナトリウム（pH7.6）、5×デンハート液、10%硫酸デキストラン、および20μg/mlの変性剪断サケ精子DNAを含む）中にて42℃で一晩インキュベーションした後、約65℃にて0.1×SSC中でフィルタを洗浄することが意図されるが、ハイブリダイゼーションさせるポリヌクレオチドによって、高ストリンジェンシーでの洗浄条件は適宜変更され、例えば、哺乳類由来DNAを用いる場合は、0.1% SDSを含む0.5×SSC中にて65℃での洗浄（好ましくは15分間×2回）が好ましく、E. coli由来DNAを用いる場合は、0.1% SDSを含む0.1×SSC中にて68℃での洗浄（好ましくは15分間×2回）が好ましく、RNAを用いる場合は、0.1% SDSを含む0.1×SSC中にて68℃での洗浄（好ましくは15分間×2回）が好ましく、オリゴヌクレオチドを用いる場合は、0.1% SDSを含む0.1×SSC中にてハイブリダイゼーション温度での洗浄（好ましくは15分間×2回）が好ましい。また、上記ハイブリダイゼーションは、Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1989)に記載されている周知の方法で行うことができる。

[0044] (a) または (b) のタンパク質をコードする塩基配列からなるDNAを含むベクターとしては特に限定されず、宿主に応じて適宜選択することができる。上記ベクターは、導入されるべき宿主に依存して、発現制御領域（例えば、プロモーター、ターミネーター、および/または複製起点等）を含有することが可能である。プロモーターとしては、ウイルス性プロモーター（例えば、SV40初期プロモーター、SV40後期プロモーター等）などが

挙げられる。また、上記プロモーターとしては、IPTGなどによって発現を誘導することが可能な発現誘導性プロモーターであってもよい。

[0045] 上記ベクターは、少なくとも1つの選択マーカを含むことが好ましい。このようなマーカとしては、アンピシリン、ジヒドロ葉酸レダクターゼ、ネオマイシン耐性遺伝子などが挙げられる。上記選択マーカを用いれば、ベクターが宿主に導入されたか否か、さらには、所望のタンパク質が宿主中で確実に発現しているか否かを確認することができる。

[0046] 上記ベクターを宿主へ導入する方法は特に限定されず、適宜、周知の方法を用いることが可能である。例えば、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法等の従来公知の方法を好適に用いることができる。更に具体的には、エシェリヒア属に属する宿主微生物にベクターを導入する場合は、カルシウムイオンの存在下で組換えDNAを導入する方法や、エレクトロポレーション法を用いる方法が適用され得る。

[0047] 次いで、宿主内で発現させたタンパク質を可溶化させる工程について説明する。

[0048] 上記宿主内で発現させたタンパク質を可溶化させる工程は、タンパク質を発現している宿主を溶液中で破碎する工程を包含し得る。上記宿主内で発現させたタンパク質を可溶化させる工程は、タンパク質を発現している宿主を溶液中で破碎する工程に加えて、更に、破碎物を遠心分離する工程を包含していてもよい。上記構成によれば、溶液中にタンパク質を大量に可溶化させることができるので、当該溶液から、所望のタンパク質を大量かつ高純度にて精製することができる。

[0049] 宿主を破碎するための溶液としては特に限定されないが、例えば、界面活性剤（例えば、Tween-20（登録商標）、Triton-X100（登録商標）またはSDSなど）、NaCl、または、これらの両方を含む溶液であり得る。

[0050] 上記溶液における界面活性剤の濃度は特に限定されないが、例えば、0（w/v）または0（w/v）よりも多く1.0%（w/v）以下であること

が好ましく、0 (w/v) または0 (w/v) よりも多く0.5% (w/v) 以下であることが更に好ましく、0 (w/v) または0 (w/v) よりも多く0.3% (w/v) 以下であることが更に好ましく、0 (w/v) または0 (w/v) よりも多く0.1% (w/v) 以下であることが更に好ましく、0 (w/v) または0 (w/v) よりも多く0.01% (w/v) 以下であることが最も好ましい。なお、上述した数値範囲の下限値は、0.01% (w/v) または0.001% (w/v) であってもよい。本実施形態において、宿主内で発現されるタンパク質は、元々、溶液に対する可溶性が高い。それ故に、低濃度の界面活性剤であっても、十分に溶液中に可溶化させることが可能である。

[0051] 界面活性剤は、様々な化学反応を阻害する恐れがある。例えば、界面活性剤が存在すると、亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質を用いてNADHまたはNADPHなどを製造するときに、化学反応が阻害される恐れがある。本実施形態における亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の製造方法であれば、亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質を可溶化させるための界面活性剤の濃度は低くて良いので、製造された亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質中に混入する界面活性剤の量を低く抑えることができる。その結果、製造された亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質を用いて、NADHまたはNADPHなどを製造するときに、効率よく大量のNADHまたはNADPHを製造することができる。

[0052] 上記溶液におけるNaClの濃度は特に限定されないが、例えば、0mMまたは0mMよりも多く150mM以下であることが好ましく、0mMまたは0mMよりも多く100mM以下であることが更に好ましく、0mMまたは0mMよりも多く50mM以下であることが更に好ましく、0mMまたは0mMよりも多く40mM以下であることが更に好ましく、0mMまたは0mMよりも多く20mM以下であることが更に好ましく、0mMまたは0mMよりも多く10mM以下であることが更に好ましく、0mMであることが最も好ましい。なお、上述した数値範囲の下限値は、0.01mMまたは0

、0.01 mMであってもよい。本実施形態において、宿主内で発現されるタンパク質は、元々、溶液に対する可溶性が高い。それ故に、低濃度のNaClであっても、十分に溶液中に可溶化させることが可能である。

[0053] 後述する実施例でも示すように、NaClは、亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の活性を阻害する効果を有している。それ故に、可能な限りNaClの濃度を低下させた溶液中に亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質を可溶化させることが好ましいといえる。なお、従来の亜リン酸デヒドロゲナーゼは可溶性が低いので、タンパク質を可溶化させるために界面活性剤に加えて高濃度のNaClを用いていた。一方、本実施形態における亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の製造方法であれば、亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質を可溶化させるためのNaClの濃度は低くて良いので、製造された亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質中に混入するNaClの量を低く抑えることができる。その結果、製造された亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質を用いて、NADHまたはNADPHなどを製造するときに、効率よく大量のNADHまたはNADPHを製造することができる。

[0054] 上記溶液は、公知の緩衝剤によって、そのpHが調節され得る。上記緩衝剤としては特に限定されないが、6.0～8.5のpH範囲において十分な緩衝能力を有する任意の緩衝剤を使用することができる。このpH範囲の緩衝剤としては、リン酸塩、トリス、ビストリスプロパン、N-トリス（ヒドロキシメチル）メチル-2-アミノエタンスルホン酸（TES）、2-モルフォリノエタンスルホン酸1水和物（MES）、ピペラジン-1,4-ビス（2-エタンスルホン酸）（piperazine-1,4-bis（2-ethanesulfonic acid））（PIPES）、2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸（2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid）（HEPES）、および3-[N-トリス（ヒドロキシメチル）メチルアミノ]-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸（TAPSO）などが挙げられる。溶液中の緩衝剤の濃度は特に限定されないが、例えば、20～200 mMであり得る。

- [0055] 本実施形態の亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の製造方法は、上記タンパク質を発現している宿主、または、上記タンパク質を発現している宿主の破砕物を加熱する工程を包含することが可能である。後述する実施例に示すように、本実施形態の亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質は耐熱性が高い。それ故に、上記加熱する工程によって、亜リン酸デヒドロゲナーゼの活性を失うこと無く、他の不要な酵素の活性を失わせることが可能である。つまり、本実施形態の製造方法によって得られる亜リン酸デヒドロゲナーゼに不要な酵素の活性が混入することを防止することができる。
- [0056] 上記加熱する工程を行うための具体的な方法は特に限定されないが、例えば、タンパク質を発現している宿主を含む培養液を加熱することが可能であり、タンパク質を発現している宿主を培養液から分離した後で当該宿主を加熱することも可能であり、タンパク質を発現している宿主を培養液から分離した後で当該宿主を破砕し、当該破砕物を加熱することも可能である。
- [0057] 上記加熱する工程は、上記タンパク質を発現している宿主、または、上記タンパク質を発現している宿主の破砕物を、35℃～55℃に加熱することが好ましく、40℃～52.5℃に加熱することが更に好ましく、40℃～50℃に加熱することが更に好ましく、40℃～45℃に加熱することが最も好ましい。
- [0058] 加熱する時間は特に限定されないが、例えば、0分間～60分間であることが好ましく、15分間～30分間であることが更に好ましい。
- [0059] 上記加熱する工程では、発現している亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質とプロテアーゼ阻害剤とを共存させることが好ましい。上記構成によれば、たとえプロテアーゼが存在したとしても、当該プロテアーゼによって亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質が分解されることを防止することができる。
- [0060] 上記プロテアーゼ阻害剤としては特に限定されず、適宜、公知のプロテアーゼ阻害剤を用いることが可能である。上記プロテアーゼ阻害剤としては、例えば、低分子量インヒビター（例えば、ジイソプロピルフルオロリン酸、

フェニルメタンスルホニルフルオリド、*p*-メルクリ安息香酸、ヨード酢酸、ジアゾアセチル-DL-ノルロイシンメチルエステル、ホスホラミドなど)、ペプチド性インヒビター(例えば、ロイペプチン、アンチパイン、キモスタチン、ペプスタチンなど)、タンパク質性インヒビター(例えば、 $\alpha 2$ マクログロブリン、カルパスタチンなど)を挙げることができるが、これらに限定されない。

[0061] [3. NADHまたはNADPHの製造方法]

本実施形態のNADHの製造方法は、本発明の亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の製造方法によって製造される亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質を酵素として用いて、 HPO_3^{2-} と NAD^+ と H_2O とを反応させる方法である。なお、具体的な反応式については、[背景技術]の欄の(反応式1)を参照のこと。

[0062] 本実施形態のNADPHの製造方法は、本発明の亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の製造方法によって製造される亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質を酵素として用いて、 HPO_3^{2-} と NADP^+ と H_2O とを反応させる方法である。なお、具体的な反応式については、[背景技術]の欄の(反応式2)を参照のこと。

[0063] 上記反応を行う時の温度は特に限定されないが、例えば、 $35^\circ\text{C}\sim 55^\circ\text{C}$ であることが好ましく、 $40^\circ\text{C}\sim 52.5^\circ\text{C}$ であることが更に好ましく、 $40^\circ\text{C}\sim 50^\circ\text{C}$ であることが更に好ましく、 $40^\circ\text{C}\sim 45^\circ\text{C}$ であることが最も好ましい。後述する実施例に示すように、本発明の亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の製造方法によって製造される亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質は、従来の亜リン酸デヒドロゲナーゼと比較して、至適温度が非常に高い。それ故に、上記構成によれば、効率よく大量のNADHまたはNADPHを製造することができる。また、上記構成によれば、反応温度が高いため、反応系に不要な酵素が混入していたとしても、混入した不要な酵素の活性のみを失わせることができる。

[0064] なお、反応系を上記温度へ調節する場合には、反応系に対して外部から温

度を加えることによって温度を調節してもよいが、化学反応が進むにつれて発生する反応熱などによって温度を調節してもよい。つまり、本発明の亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の製造方法によって製造される亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質を用いれば、反応系を冷却する必要がないという利点もある。

[0065] 上記反応は、亜ヒ酸塩、硝酸塩、硫酸塩またはNaClの存在下で行われることも可能である。後述する実施例に示すように、従来の亜リン酸デヒドロゲナーゼは、亜ヒ酸塩、硝酸塩、硫酸塩またはNaClの存在によって、大幅に活性が低下する。一方、本発明の亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の製造方法によって製造される亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質は、亜ヒ酸塩、硝酸塩、硫酸塩またはNaClが存在しても、大幅に活性が低下することはない。それ故に、本実施形態のNADHまたはNADPHの製造方法であれば、たとえ亜ヒ酸塩、硝酸塩、硫酸塩またはNaClが存在したとしても、効率よくNADHまたはNADPHを製造することができる。

[0066] 反応系における亜ヒ酸塩、硝酸塩、硫酸塩またはNaClの濃度は特に限定されないが、例えば、100mM以下であることが好ましく、70mM以下であることが更に好ましく、50mM以下であることが更に好ましく、40mM以下であることが最も好ましいが、これらに限定されない。なお、その下限値は特に限定されないが、0.1mM、0.01mMまたは0mMであり得る。

[0067] [4. NADHまたはNADPHを製造するためのキット]

本実施形態のキットは、NADHまたはNADPHを製造するためのキットである。

[0068] 本実施形態のキットは、本発明の亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の製造方法によって製造されるタンパク質を備えるものであり得る。また、本実施形態のキットは、本発明の亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質を所望の宿主内で発現させるためのベクターを備えるものであってもよい。これらの構成の詳細については既に説明したので、ここではその説明を省略する。

- [0069] 本発明の遺伝子は、本発明のタンパク質をコードする遺伝子である。
- [0070] 本発明の遺伝子は、以下の(c)または(d)のDNAからなる遺伝子であってもよい。つまり、
- (c) 配列番号2の塩基配列からなるDNA、
 - (d) 配列番号2の塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ、亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質をコードするDNA。
- [0071] 本発明の亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の製造方法は、本発明のタンパク質を宿主内で発現させる工程と、上記宿主内で発現させたタンパク質を溶液中に可溶化させる工程と、を有し得る。
- [0072] 本発明の亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の製造方法では、上記発現させる工程は、本発明の遺伝子を含むベクターを宿主へ導入する工程を包含し得る。
- [0073] 本発明の亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の製造方法では、上記可溶化させる工程は、上記タンパク質を発現している宿主を、0 (w/v) または0 (w/v) よりも多く0.1% (w/v) 以下の界面活性剤、および、0 (w/v) または0 (w/v) よりも多く50mM以下のNaClの少なくとも一方を含有する溶液中で破碎する工程を包含し得る。
- [0074] 本発明の亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の製造方法では、上記界面活性剤は、Tween-20またはTriton-X100であってもよい。
- [0075] 本発明の亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の製造方法は、上記タンパク質を発現している宿主、または、上記タンパク質を発現している宿主の破碎物を加熱する工程を包含し得る。
- [0076] 本発明の亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の製造方法では、上記加熱する工程は、上記タンパク質を発現している宿主、または、上記タンパク質を発現している宿主の破碎物を、40℃~50℃へ加熱する工程であってもよい。

- [0077] 本発明のNADHまたはNADPHの製造方法では、本発明のタンパク質、または、本発明の製造方法によって製造される亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質を酵素として用いて、 HPO_3^{2-} と、 NAD^+ または NADP^+ と、 H_2O とを反応させる。
- [0078] 本発明のNADHまたはNADPHの製造方法では、上記反応は、 40°C ～ 50°C にて行われ得る。
- [0079] 本発明のNADHまたはNADPHの製造方法では、上記反応は、亜ヒ酸塩、硝酸塩、硫酸塩または NaCl の存在下で行われ得る。

実施例

- [0080] [1. 耐熱性を指標とした亜リン酸デヒドロゲナーゼのスクリーニング]
45°Cの環境下においても生育し得、かつ、亜リン酸依存的なNADH生産能を有する微生物をスクリーニングした。以下に、スクリーニングの詳細について説明する。
- [0081] 採取した土壌を無菌水へ溶解した後、0.4 mLの溶解物を、0.5 mMの亜リン酸を含有するMOPS液体培地 (0.5 mM phosphite、22.2 mM glucose、40 mM potassium morpholinopropane sulfonate [pH7.2]、50 mM NaCl、9.52 mM NH_4Cl 、4 mM Tricine、2 mM K_2HPO_4 、0.52 mM MgCl_2 、0.28 mM K_2SO_4 、0.01 mM FeSO_4 、0.0005 mM CaCl_2 、20 μM thiamine) 3.6 mLに対して加え、45°Cにて7日間の集積培養を行った。
- [0082] 7日間の集積培養の後、当該培養物を、0.5 mMの亜リン酸を含むMOPS寒天培地 (0.5 mM phosphite、22.2 mM glucose、40 mM potassium morpholinopropane sulfonate [pH7.2]、50 mM NaCl、9.52 mM NH_4Cl 、4 mM Tricine、2 mM K_2HPO_4 、0.52 mM MgCl_2 、0.28 mM K_2SO_4 、0.01 mM FeSO_4 、0.

0.005 mM CaCl_2 、20 μM thiamine、1.5% Agar)、2 mMのリン酸を含むMOPS寒天培地、および、亜リン酸およびリン酸を含まないMOPS寒天培地に植菌し、45℃にて1～3日間の培養を行った。その後、0.5 mMの亜リン酸を含むMOPS寒天培地上に出現した微生物のコロニーを、複数個、単離した。

[0083] 各コロニーを形成する微生物を、0.5 mMの亜リン酸を含有するMOPS液体培地を用いて培養し、各微生物について、亜リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するか否か検討した。

[0084] 以下に、亜リン酸デヒドロゲナーゼ活性の測定方法について説明する。

[0085] グリセロール溶液中にて凍結保存している各微生物を、4 mLの2×YT液体培地に植菌し、45℃にて一晩培養した。1 mLの培養液を1.5 mL容量のチューブ内へ入れ、当該チューブを12000 rpmにて5分間遠心分離した後、上清を捨てて菌体のペレットを得た。

[0086] 培地由来のリン酸を除くために、上記菌体のペレットを1 mLのMOPS (0) 溶液 (リン成分を含まないMOPS培地) 中に懸濁し、当該懸濁液を12000 rpmにて5分間遠心分離した後、上清を捨てて菌体のペレットを得た。当該洗浄操作をもう一度行った後、得られた菌体のペレットを1 mLのMOPS (0) 溶液中に懸濁した後、100 μL の当該懸濁液を10 mLのMOPS-亜リン酸 (0.5 mM) 液体培地に植菌して、45℃にて培養した。

[0087] 24～72時間の培養を行って、 OD_{600} の値が1.5～2.0に達した時に、全培養液を50 mLの容量のチューブに移し、当該チューブを6000 rpm、10分間の遠心分離処理にかけた。遠心分離処理の後、上清を捨てて菌体のペレットを得た。

[0088] 上記菌体のペレットを10 mLのMOPS (0) 溶液中に懸濁した後で、出力20%にて、10分間の超音波破碎 (Digital sonifier, BRANSON) を行った。超音波破碎処理を施したMOPS (0) 溶液を超遠心分離用チューブ (Centrifuge Tubes, BECKMAN, 349622) に分注し、当該チューブを、超遠心

分離機 (Optima™ TLX Ultracentrifuge, BECKMAN COULTER) にて、270,000×g、4℃、45分間の超遠心分離にかけた。

[0089] 超遠心分離後の上清を回収して、当該上清を、亜リン酸デヒドロゲナーゼ活性測定用の粗抽出液とした。当該粗抽出液 (タンパク質量: 10 μg)、NAD⁺ (1 mM)、亜リン酸 (1 mM) および MOPS-KOH buffer (20 mM、pH 7.4) を含む、全量 1000 μL の反応液を調製し、当該反応液の温度を 45℃ に上昇させて反応を開始させた。所定の時間の間 (0~180分)、所定の時間間隔にて 100 μL ずつのサンプルを採取し、各サンプルの吸光度 (340 nm) を測定した。亜リン酸デヒドロゲナーゼ活性は、1 mg のタンパク質が単位時間あたりに生成する NADH 量として評価した。

[0090] 以上のようにして、45℃の条件下においても生育し得、かつ、亜リン酸依存的に NADH 生産能を有する微生物をスクリーニングした。なお、スクリーニングされた微生物の数は、5 菌株であった。

[0091] [2. スクリーニングした微生物の分類、および、亜リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の取得]

上述した 5 菌株の粗抽出液中の亜リン酸デヒドロゲナーゼ活性はほぼ同程度であるとともに、当該 5 菌株は形態学および生理学的に似ていた。それ故に、上記 5 菌株は、全て近縁種の菌であると考えられた。そこで、そこで、5 菌株中で最も増殖に優れた菌株 (4506 株) を以降の解析に用いた。

[0092] まず、4506 株を、16S rRNA (16S ribosomal RNA) の塩基配列に基づいて分類するとともに、各菌株の亜リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の塩基配列を決定した。具体的な方法について、以下に詳細に説明する。

[0093] 文献 (J.R. Marchesi, et al., Applied and Environmental Microbiology, 64, p. 795-799 (1998)) に従って、上記スクリーニングによって得られた 4506 株から染色体 DNA を抽出し、当該染色体 DNA を用いて 16S rRNA 遺伝子を増幅した。

[0094] まず、16S rRNA 遺伝子を PCR によって増幅した。当該 PCR に

は、プライマーとして、後述するプライマー1およびプライマー2を用い、東洋紡社製のKOD-plusを用いてPCR反応を行った。具体的なPCR反応条件としては、72℃にて5分間保温した後で、95℃の1分間の変性工程、55℃の1分間のアニーリング工程および72℃の1.5分間の伸長工程の3つの工程からなる反応サイクルを30サイクル行った。

・プライマー1：5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (配列番号5)

・プライマー2：5' -GTCCCGCAACGAGCGCAAC-3' (配列番号6)

以上のようにして増幅した16S rRNAの塩基配列を、DYEnamic ET Terminator (アプライドバイオシステムズ社製)を用いて決定した。具体的な方法は、DYEnamic ET Terminatorに添付のプロトコールに従った。

[0095] 以上のようにして決定した16S rRNAの塩基配列を系統樹作成ツールであるClustal W2によって解析することにより、上述した4506株を分類した。なお、当該解析の具体的な方法は、Clustal W2に添付のプロトコールに従った。

[0096] 図1に、スクリーニングされた4506株の系統樹を示す。この結果より、4506株はRalstonia属のバクテリアであることが明らかとなった。このことから当該菌株をRalstonia sp. strain 4506と名付けた。

[0097] 図1中の「Ralstonia sp. 4506」が、スクリーニングされた4506株である。また、「Ralstonia sp. 5_7_47FAA」、「Ralstonia metallidurans CH34」、「Alcaligenes faecalis WN2072」および「Pseudomonas stutzeri WM88」は、周知の菌株であるとともに、その亜リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子および亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質も周知であるか、または、亜リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子および亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の存在が予測されていた。

[0098] 「Ralstonia sp. 5_7_47FAA」は、分類学上、4

506株と近縁であるとともに、その亜リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の存在が予測されていた。但し、当該亜リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子がコードするタンパク質が実際に亜リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有しているか否かは実証されていないとともに、亜リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の3'末端側の塩基配列（換言すれば、亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質のC末端側のアミノ酸配列）は、未知であった（例えば、「<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/308920199>」参照）。勿論、「5747FAA」の推定上の亜リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子がコードする亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の各種性質（例えば、可溶性および熱安定性など）については、全く解析されていなかった。

[0099] スクリーニングにおいて4506株は45℃で生育したため、本菌が有する亜リン酸デヒドロゲナーゼは耐熱性を有することが予想されたため、当該菌株から亜リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子のスクリーニングを試みた。

[0100] 4506株の亜リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子（ptxD）は、既知のものとは異なると考えられたため、周知の亜リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の高度保存領域に基づいて設計したプライマーを用いたPCRによって遺伝子の内部領域を取得するとともに、インバースPCRによって遺伝子の5'領域および3'領域を取得することによって、亜リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の全長配列の取得を取得した。以下に、当該方法について、更に詳細に説明する。

[0101] まず、周知のptxDにおいて高度に保存された2箇所のアミノ酸配列（Pstutzeri WM88の76-82番目、261-267番目）に基づいて、縮重プライマー（PTXD1およびPTXD2）を作製した。以下に、これらの縮重プライマーの塩基配列を示す。

・PTXD1：5' -AARGGNTAYGAYAAAYTTYGAY-3'（配列番号7）

・PTXD2：5' -RTCYTCCATYTCRTANACRTC-3'（配列番号8）

上記縮重プライマーを用いて、4506株の染色体を鋳型としてPCRを行った。その結果、約600bpの増幅されたDNA断片を取得した。

[0102] 増幅されたDNA断片を pGEM T-easy vector (Promega社) へクローニングして、増幅されたDNA断片の塩基配列を決定した。決定された塩基配列から、増幅されたDNA断片が、ptxDの内部配列であることが確認された。

[0103] 決定された塩基配列に基づいてインバースPCR用のプライマー (PTXD3およびPTXD4) を作製した。以下に、これらのプライマーの塩基配列を示す。

・PTXD3 : 5' -TCGTGGATGAGAATGCGGTGATAGC-3' (配列番号9)

・PTXD4 : 5' -ATAGTCAGTTCAGCGGTCGGGATCG-3' (配列番号10)

インバースPCRのテンプレートとしては、4506株の0.5 μgの染色体を0.5 μLの制限酵素Pst Iを用いて12時間消化した後に、T4 DNA Ligaseを用いて自己環状化させて更に精製したものを、インバースPCRの反応溶液の全体積に対して20%量用いた。PTXD3とPTXD4とを用いたインバースPCRによって、約2.5 kbのDNA断片を得た。

[0104] 上記DNA断片を pGEM T-easy vectorへクローニングした後、当該DNA断片の両末端側の塩基配列を決定し、ptxDの5'領域および3'領域を決定した。これらの配列に基づいて、ptxDの全長配列を取得するためのプライマー (PTXD5およびPTXD6) を作製した。以下に、これらのプライマーの塩基配列を示す。

・PTXD5 : 5' -CGGGATCCGATGAAGCCCAAAGTCGTCCTC-3' (配列番号11)

・PTXD6 : 5' -CGGAATTCGCCGCCTTTACTCCCGGATAC-3' (配列番号12)

PTXD5およびPTXD6を用いて、4506株の染色体を鋳型としてPCRを行い、約1 kbのDNA断片を増幅した。増幅されたDNA断片の塩基配列を、上記と同様の方法にて決定した。

[0105] 上記亜リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の塩基配列を配列番号2に示す。ま

た、当該亜リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子がコードする亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質のアミノ酸配列を配列番号1に示す。なお、上述した「<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/308920199>」に記載されている塩基配列は、配列番号1に示す塩基配列の部分配列と完全に一致していた。

[0106] [3. 大腸菌を用いた亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の発現]

周知の方法によって、プラスミドである pET21b (Novagen社製) へ、上述した配列番号2に示す塩基配列、または、P stutzeri WM88の亜リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (配列番号4) を挿入した (配列番号4の塩基配列によってコードされているタンパク質のアミノ酸配列を配列番号3に示す)。これによって、配列番号1に示す亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質のC末端にHisタグが連結している融合タンパク質 (図2の「Pt x D₄₅₀₆」参照)、または、P stutzeri WM88の亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質のC末端にHisタグが連結している融合タンパク質 (図2の「Pt x D_{Pst}」参照) の発現ベクターを作成した。

[0107] 周知の方法によって、上記発現ベクターの各々を用いて、コンピテントセルである Rosetta 2 (DE3) (Novagen社製) を形質転換した。

[0108] 上記形質転換体を、200mLのLB培地 (培地1Lあたり、10gの polypeptone、5gの yeast extract、および、5gの NaClを含む) へ植菌し、OD₆₀₀が0.5になるまで37℃にて培養した。その後、当該培養物に対して濃度が1mMになるようにIPTG (isopropyl thiogalactoside) を加え、28℃にて更に3時間の培養を行った。

[0109] 上記培養物を、6,000rpm、15分間の遠心分離処理にかけ、沈殿物である菌を回収した。当該菌を破碎用バッファー (50mM Tris-HCl (pH: 7.4)、50mM NaCl) へ懸濁した後、当該懸濁物に対して超音波処理を施すことによって、菌を破碎した。この後、菌の破碎液に対して最終濃度が0.1%になるようにTween 20 (登録商標) を加えて、氷上で15分間静置した。なお、図2において、当該破碎された菌を含む破碎用バッファーを「T」として示す。

- [0110] 破碎された菌を含む破碎用バッファーに対して、15,000 rpm、4℃、15分間の条件にて遠心分離処理を施した。遠心分離処理の後、上清と沈殿物とに分けた。なお、図2において、当該上清を「S」として示し、当該沈殿物を「I」として示す。
- [0111] 上記上清をHisTrapカラム（GEヘルスケア社製）へ供し、当該カラムに添付されたプロトコールにしたがって、配列番号1に示す亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質のC末端にHisタグが連結している融合タンパク質を精製した。
- [0112] 上述した、破碎された菌を含む破碎用バッファー（T）、上清（S）および沈殿物（I）をSDS-PAGEにて分離した後、アクリルアミドゲルをCBBステインワン（ナカライ社製）にて染色して、亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の量を測定した。
- [0113] その結果を図2に示す。
- [0114] P stutzeri WM88の亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質のC末端にHisタグが連結している融合タンパク質の場合には、融合タンパク質の約18.4%が上清（S）中に存在し、融合タンパク質の約81.6%が沈殿物（I）中に存在していた。一方、配列番号1に示す亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質のC末端にHisタグが連結している融合タンパク質の場合には、融合タンパク質の約91.4%が上清（S）中に存在し、融合タンパク質の約8.6%が沈殿物（I）中に存在していた。以上の結果から、配列番号1に示す亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質のC末端にHisタグが連結している融合タンパク質は、劇的に可溶性が上昇していることが明らかになった。
- [0115] [4. 亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の耐熱性]
[3. 大腸菌を用いた亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の発現]にてHisTrapカラムを用いて精製したPt x D₄₅₀₆およびPt x D_{Pst}について、耐熱性を検討した。以下に、耐熱性の測定方法について説明する。
- [0116] 精製したPt x D₄₅₀₆およびPt x D_{Pst}の各々を、最終濃度が0.2 m

g/mLになるように50mM MOPSバッファ（pH7.4）へ加え、酵素溶液を調製した。100 μ Lの上記酵素溶液を1.5mLの容量のチューブへ入れ、蒸発を防ぐために、当該酵素溶液に対して100 μ Lの*mineral oil*を添加した。当該チューブを、10 $^{\circ}$ C~60 $^{\circ}$ Cの温度で12時間維持した。経時的に10 μ L（2 μ g）の酵素溶液をサンプリングして、当該酵素溶液に対して、1mMのNAD⁺および1mMの亜リン酸を含む20mMのMOPS-KOH buffer（pH7.4）490 μ Lを加えて、合計500 μ Lの反応系で、亜リン酸デヒドロゲナーゼ活性の測定を行った。

[0117] 図3に測定結果を示す。

[0118] 図3に示すように、Pt \times D_{Pst}は、約35 $^{\circ}$ Cにて比活性が最も高く、35 $^{\circ}$ Cよりも低い温度であっても、35 $^{\circ}$ Cよりも高い温度であっても、急激に比活性が低下することが明らかになった。つまり、Pt \times D_{Pst}は、最適温度が低い（約35 $^{\circ}$ C）とともに、反応に適した温度の範囲が非常に狭いことが明らかになった。

[0119] 一方、Pt \times D₄₅₀₆は、約50 $^{\circ}$ Cにて比活性が最も高く、50 $^{\circ}$ Cよりも低い温度であっても、50 $^{\circ}$ Cよりも高い温度であっても、広い温度範囲において高い比活性を維持できることが明らかになった。具体的には、Pt \times D₄₅₀₆は、35 $^{\circ}$ C~55 $^{\circ}$ Cにおける比活性の平均値が高く、40 $^{\circ}$ C~52.5 $^{\circ}$ Cにおける比活性の平均値が更に高く、40 $^{\circ}$ C~50 $^{\circ}$ Cにおける比活性の平均値が更に高いことが明らかになった。このことは、高温になりやすい物質生産工程（例えば、NADHまたはNADPH生産工程）においても、融合タンパク質Pt \times D₄₅₀₆が、安定して大量の物質を生産し得ることを示している。また、このことは、亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の製造工程において、亜リン酸デヒドロゲナーゼを加熱したとしても、その活性が失われないことを示している。

[0120] [5. 亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の反応速度論的解析]

[3. 大腸菌を用いた亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の発現]にて

H i s T r a pカラムを用いて精製したP t x D₄₅₀₆およびP t x D_{P s t}について、反応速度を比較した。以下に、反応速度の測定方法について説明する。

[0121] 〔背景技術〕の欄に記載した（反応式1）に基づいて、P t x D₄₅₀₆およびP t x D_{P s t}の反応速度を算出した。

[0122] 具体的には、（反応式1）に示す反応系において、7.5 μ gの融合タンパク質を用い、基質（NAD⁺）の濃度を0.5 μ Mから200 μ Mへと変化させながら、NADHの生産速度を測定した。なお、融合タンパク質P t x D₄₅₀₆の反応温度は、40℃であり、融合タンパク質P t x D_{P s t}の反応温度は、28℃であった。

[0123] 測定された基質（NAD⁺）の濃度およびNADHの生産速度に基づいて、周知の酵素反応速度論的手法（例えば、「蛋白質・酵素の基礎実験法（改訂第2版）、発行所：株式会社 南江堂」参照）に基づいて、K_m (μ M)、V_{max} (μ mol/min/mg)、K_{cat} (min⁻¹)、K_{cat}/K_mの値を算出した。なお、上述した各種パラメータは、3回行った実験の各々について算出するとともに、3回行った実験の平均値として算出した。また、K_{cat}は、「K_{cat}=V_{max} (μ mol/min/mg) × (MW/10³)」の式にて算出した。

[0124] 実験結果を、下記表1に示す。

[0125]

[表1]

タンパク質 (分子量)	実験番号	データ	Km (μ M)	Vmax (μ mol/min/mg)	Kcat (min^{-1})	Kcat/Km
PtxD _{Pst} (MW:39904)	1	110326	74.4	4.9	194.1	2.6
	2	110329	71.2	4.1	163.9	2.3
	3	110330	74.7	3.8	150.8	2.0
	平均値		73.4	4.2	169.6	2.3
	SD		1.9	0.6	22.2	0.3
PtxD ₄₅₀₆ (MW:40076)	1	110326	22.6	6.4	255.7	11.3
	2	110329	23.3	6.1	244.1	10.5
	3	110330	25.1	5.3	212.4	8.5
	平均値		23.7	5.9	237.4	10.1
	SD		1.3	0.6	22.4	1.5

[0126] 表1から明らかなように、PtxD₄₅₀₆のKmは、PtxD_{Pst}のKmの約1/3であった。また、PtxD₄₅₀₆のVmaxは、PtxD_{Pst}の約1.4倍であった。また、PtxD₄₅₀₆のKcatは、237.4 (min^{-1})であり、PtxD_{Pst}のKcatは、169.6 (min^{-1})であった。

[0127] 以上の実験データから、PtxD₄₅₀₆のKcat/Kmは、PtxD_{Pst}のKcat/Kmの約4.4倍であることが明らかになった。つまり、PtxD₄₅₀₆は、PtxD_{Pst}よりも高い反応効率を有することが明らかになった。

[0128] [6. 阻害剤存在下における亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の活性]

[3. 大腸菌を用いた亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の発現]にてHisTrapカラムを用いて精製したPtxD₄₅₀₆およびPtxD_{Pst}について、様々な阻害剤が存在する環境下においても触媒活性を示し得るか否かを検討した。実験方法は、文献「Costas et al., Journal of Biological Chemistry, 2001, 276, 17429-17436」に記載の方法に従った。以下に、簡単に実験方法を説明する。

[0129] 100 μ Lの100 mM MOPS-KOH (pH 7.25)、50 μ Lの10 mM NAD、5 μ Lの5 mM 亜リン酸塩、50 μ Lの40 mM

各種阻害剤（亜ヒ酸塩（Arsenite）、硝酸塩（Nitrate）、硫酸塩（Sulfate）またはNaCl）、294 μLのH₂O、および、1 μLの0.5 mg/mLタンパク質含有液（Pt × D₄₅₀₆含有液、Pt × D_{Pst}含有液、または、タンパク質を含有しない液体（ネガティブコントロール））を混合して反応液を生成した。

[0130] 上記反応液を、60分間反応させた。なお、Pt × D₄₅₀₆については、45℃にて反応を行い、Pt × D_{Pst}については、30℃にて反応を行った。その後、OD₃₄₀を測定した。タンパク質を含有しない液体（ネガティブコントロール）のOD₃₄₀の値を100として、各サンプルのOD₃₄₀の相対値を算出した。なお、各実験を4回以上行い、当該4回または5回の実験における相対値の平均値も算出した。

[0131] 実験結果を、下記表2に示し、表2の数値データをグラフ化した図面を図4に示す。

[0132] [表2]

		1	2	3	4	5	平均値	SD
PtxD ₄₅₀₆	阻害剤なし	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.0
	Arsenite	102.6	102.2	101.7	101.3	100.2	101.6	0.9
	Nitrate	29.2	39.6	40.2	40.3	29.3	35.7	5.9
	Sulfite	—	53.2	58.8	57.0	40.9	52.5	8.1
	NaCl	92.6	96.9	95.7	95.9	87.1	93.6	4.0
PtxD _{Pst}	阻害剤なし	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.0
	Arsenite	82.3	90.4	88.5	91.4	80.7	86.6	4.8
	Nitrate	15.3	21.8	20.3	20.1	14.0	18.3	3.4
	Sulfite	—	15.4	15.3	16.2	9.2	14.0	3.3
	NaCl	95.2	91.8	86.0	84.2	76.7	89.3	5.1

（表中の「—」は、データを取得していないことを示す）

[0133] 表2および図4から明らかなように、Pt × D_{Pst}の活性は、亜ヒ酸塩、硝酸塩、硫酸塩またはNaClの存在下で阻害されることが明らかになった。

[0134] 一方、Pt × D₄₅₀₆の活性は、亜ヒ酸塩、硝酸塩、硫酸塩またはNaClの存在下であっても、高く維持されることが明らかになった。このことは、亜ヒ酸塩、硝酸塩、硫酸塩またはNaClの存在下（特に、亜ヒ酸塩、硝酸塩または硫酸塩の存在下）において亜リン酸デヒドロゲナーゼを用いる必要

がある場合には、Pt x D₄₅₀₆を用いることが有利であることを示している。なお、亜リン酸デヒドロゲナーゼを用いる必要がある場合の一例としては、NADHを生産する場合、NADPHを生産する場合、亜リン酸を定量する場合などを挙げるができるが、これらに限定されない。

[0135] 本発明は、以上説示した各構成に限定されるものではなく、特許請求の範囲に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態や実施例にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態や実施例についても本発明の技術的範囲に含まれる。

産業上の利用可能性

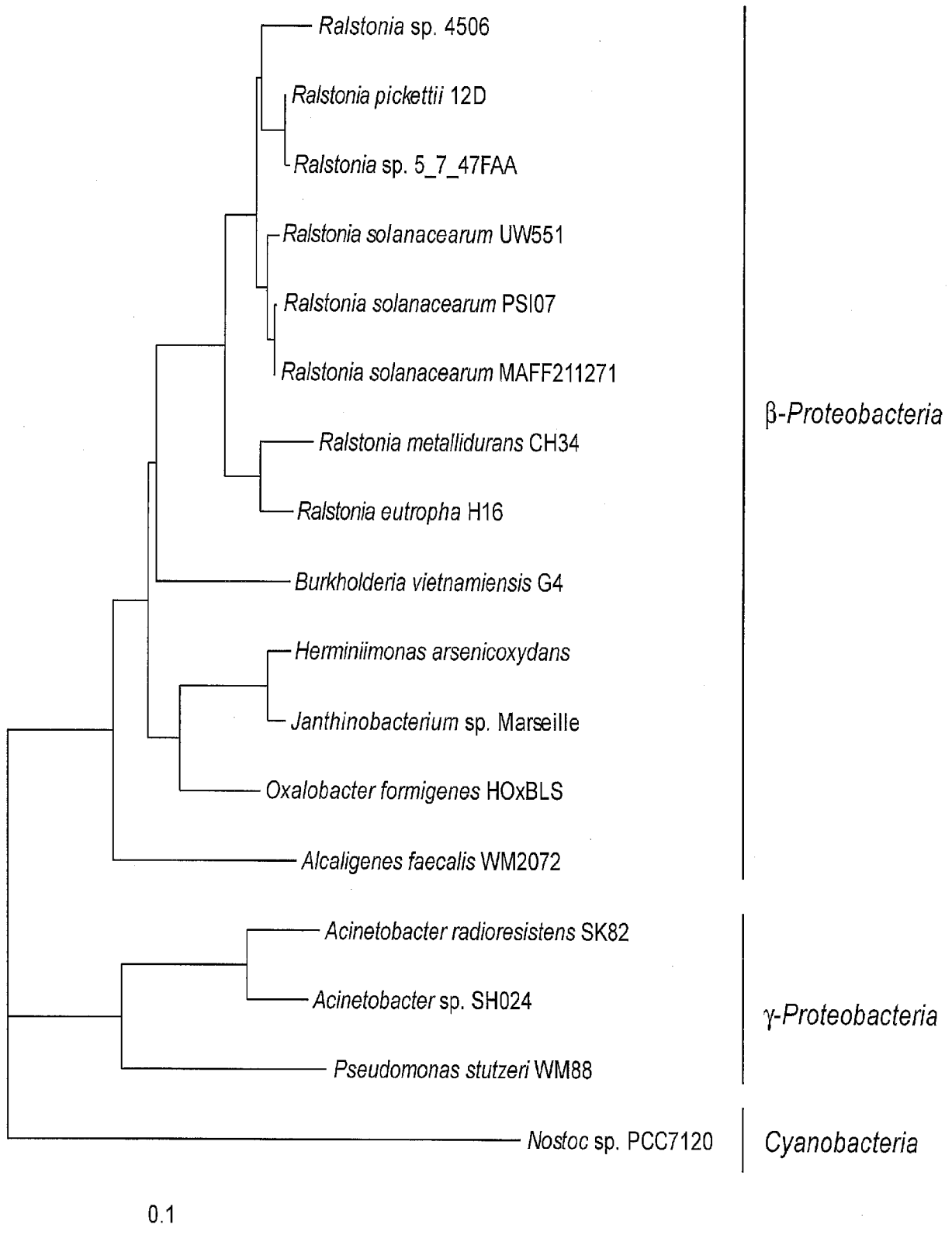
[0136] 本発明は、NADHまたはNADPHを製造する分野に利用することができる。また、本発明は、亜リン酸を定量する分野に用いることができる。

請求の範囲

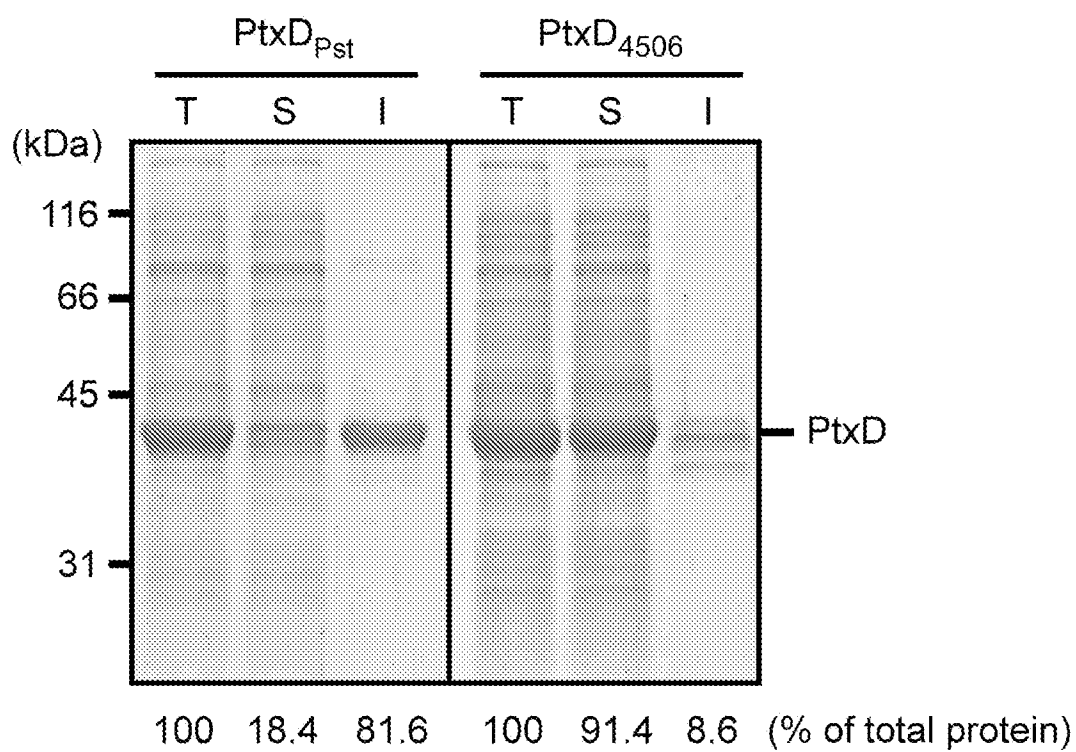
- [請求項1] 以下の（a）または（b）に記載のタンパク質。
- （a）配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質。
- （b）配列番号1のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸からなり、かつ、亜リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質。
- [請求項2] 請求項1に記載のタンパク質をコードする遺伝子。
- [請求項3] 以下の（c）または（d）のDNAからなる、請求項2に記載の遺伝子。
- （c）配列番号2の塩基配列からなるDNA。
- （d）配列番号2の塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ、亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質をコードするDNA。
- [請求項4] 請求項1に記載のタンパク質を宿主内で発現させる工程と、上記宿主内で発現させたタンパク質を溶液中に可溶化させる工程と、を有する亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の製造方法。
- [請求項5] 上記発現させる工程は、請求項2または3に記載の遺伝子を含むベクターを宿主へ導入する工程を包含する請求項4に記載の亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の製造方法。
- [請求項6] 上記可溶化させる工程は、上記タンパク質を発現している宿主を、0（w/v）または0（w/v）よりも多く0.1%（w/v）以下の界面活性剤、および、0（w/v）または0（w/v）よりも多く50mM以下のNaClの少なくとも一方を含有する溶液中で破碎する工程を包含することを特徴とする請求項4または5に記載の亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の製造方法。
- [請求項7] 上記界面活性剤は、Tween-20またはTriton-X100であることを特徴とする請求項6に記載の亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の製造方法。

- [請求項8] 上記タンパク質を発現している宿主、または、上記タンパク質を発現している宿主の破砕物を加熱する工程を包含することを特徴とする請求項4～7の何れか1項に記載の亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の製造方法。
- [請求項9] 上記加熱する工程は、上記タンパク質を発現している宿主、または、上記タンパク質を発現している宿主の破砕物を、40℃～50℃へ加熱する工程であることを特徴とする請求項8に記載の亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の製造方法。
- [請求項10] 請求項1に記載のタンパク質、または、請求項4～9の何れか1項に記載の方法によって製造される亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質を酵素として用いて、 HPO_3^{2-} と、 NAD^+ または NADP^+ と、 H_2O とを反応させることを特徴とする NADH または NADPH の製造方法。
- [請求項11] 上記反応は、40℃～50℃にて行われることを特徴とする請求項10に記載の NADH または NADPH の製造方法。
- [請求項12] 上記反応は、亜ヒ酸塩、硝酸塩、硫酸塩または NaCl の存在下で行われることを特徴とする請求項10または11に記載の NADH または NADPH の製造方法。

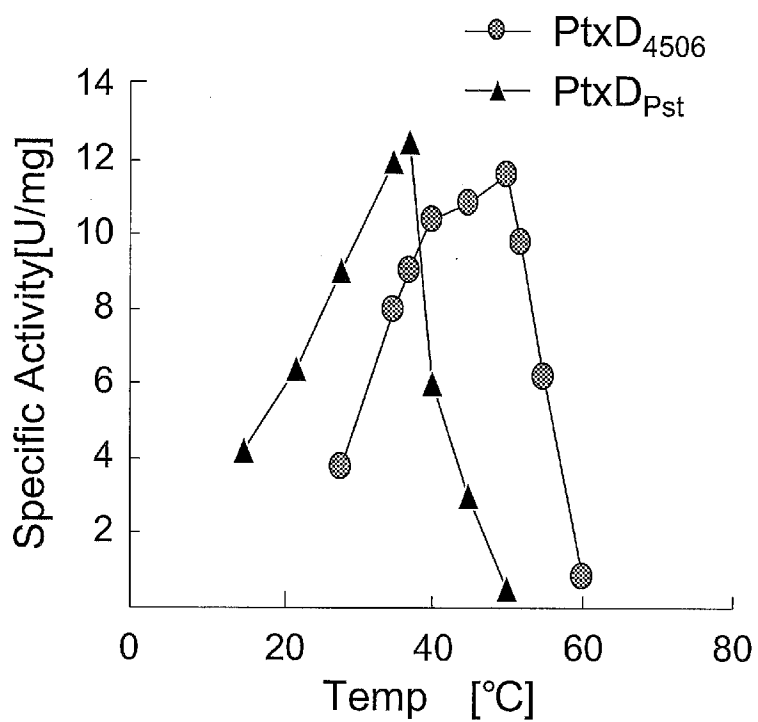
[圖1]



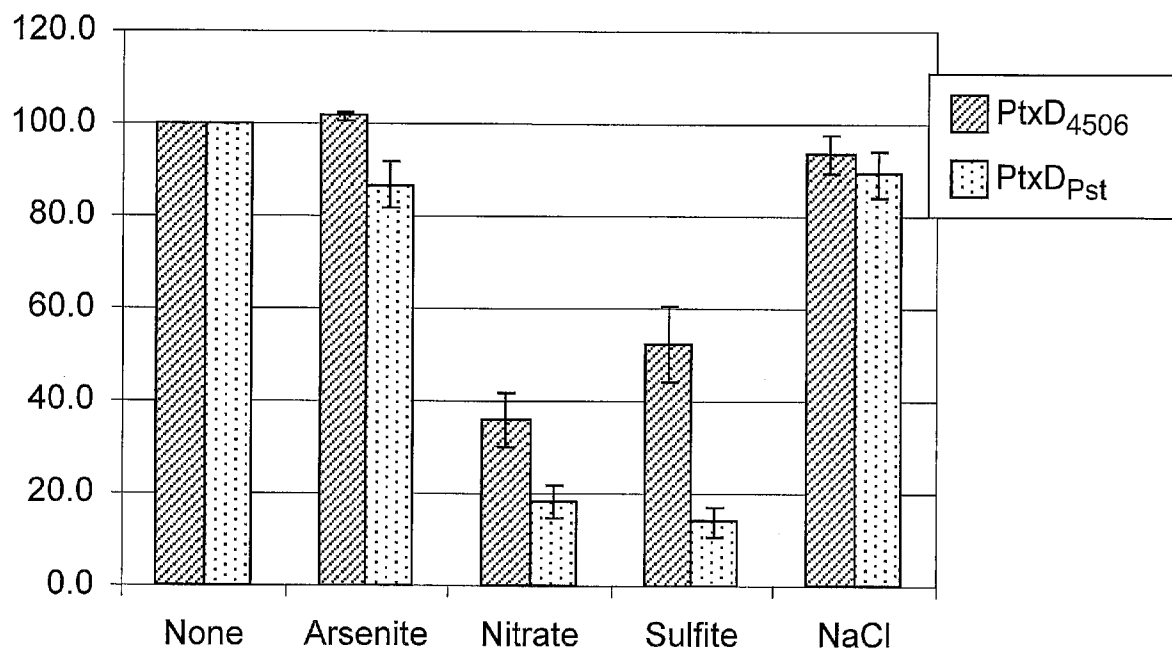
[圖2]



[圖3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/060293

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C12N9/02(2006.01)i, C12P19/36(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, C12N9/02, C12P19/36

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)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, JSTPlus (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Database GenBank [online], 19-APR-2011 uploaded, Accession No. CP002657, Definition: Alicyclophilus denitrificans K601, complete genome [retrieved on 27-APR-2012] Retrieved from the Internet: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/329308025?sat=14&satkey=10503485>	1-12
X	Database GenBank [online], 18-OCT-2010 uploaded, Accession No. EFP65990, Definition: phosphonate dehydrogenase (NAD-dependent phosphitedehydrogenase) [Ralstonia sp. 5_7_47FAA] [retrieved on 27-APR-2012] Retrieved from the Internet: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/efp65990>	1-12

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 April, 2012 (27.04.12)Date of mailing of the international search report
15 May, 2012 (15.05.12)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/060293

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WOODYER R et al., Optimizing a biocatalyst for improved NAD(P)H regeneration: directed evolution of phosphite dehydrogenase, <i>Combinatorial chemistry & high throughput screening</i> , 2006, Vol.9, No. 4, pp.237-245	1-12
A	JOHANNES TW et al., Efficient Regeneration of NADPH Using an Engineered Phosphite Dehydrogenase, <i>Biotechnol. Bioeng.</i> , 2007, Vol.96, No.1, pp.18-26	1-12
A	GARCIA COSTAS AM et al., Purification and Characterization of a Novel Phosphorus-oxidizing Enzyme from <i>Pseudomonas stutzeri</i> WM88, <i>J. Biol. Chem.</i> , 2001, Vol.276, pp.17429-17436	1-12
A	JOHANNES TW et al., Directed Evolution of a Thermostable Phosphite Dehydrogenase for NAD(P)H Regeneration, <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> , 2005, Vol.71, No.10, pp.5728-5734	1-12
A	WOODYER R et al., Mechanistic investigation of a highly active phosphite dehydrogenase mutant and its application for NADPH regeneration, <i>FEBS J.</i> , 2005, Vol.272, No.15, pp.3816-3827	1-12
A	MCLACHLAN MJ et al., Further improvement of phosphite dehydrogenase thermostability by saturation mutagenesis, <i>Biotechnology and Bioengineering</i> , 2008, Vol.99, Issue2, pp.268-274	1-12
A	VRTIS JM et al., Phosphite Dehydrogenase: A Versatile Cofactor-Regeneration Enzyme, <i>Angew. Chem. Int. Ed.</i> , 2002, Vol.41, No.17, pp.3257-3259	1-12
P,X	Ryuichi HIROTA et al., "Construction and characterization of an NADH regeneration system using phosphite dehydrogenase", Abstracts of the Annual Meeting of the Society for Biotechnology, Japan, 25 August 2011 (25.08.2011), vol.63, page 194	1-12
P,X	Tatsuya FUJIBUCHI et al., "Identification and characterization of phosphite dehydrogenase", Abstracts of the Annual Meeting of the Society for Biotechnology, Japan, 25 August 2011 (25.08.2011), vol.63, page 193	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/060293

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	Akio KURODA et al., "Biotechnology for utilizing reduced phosphorus compounds", Abstracts of the Annual Meeting of the Society for Biotechnology, Japan, 25 August 2011 (25.08.2011), vol.63, page 93	1-12
P,X	HIROTA R et al., Isolation and characterization of a soluble and thermostable phosphite dehydrogenase from <i>Ralstonia</i> sp. Strain 4506, <i>J. Biosci. Bioeng.</i> , 2012.04, Vol.113, No.4, pp.445-450, Epub. 2011.12.23	1-12

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N9/02(2006.01)i, C12P19/36(2006.01)i

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12N15/09, C12N9/02, C12P19/36

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, JSTPlus(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	Database GenBank [online], 19-APR-2011 uploaded, Accession No. CP002657, Definition: Alicyclophilus denitrificans K601, complete genome [retrieved on 27-APR-2012] Retrieved from the Internet: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/329308025?sat=14&satkey=10503485>	1-12

C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

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

国際調査を完了した日 27.04.2012	国際調査報告の発送日 15.05.2012		
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 西村 亜希子	4 N	3 4 3 5
電話番号 03-3581-1101 内線 3488			

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	Database GenBank [online], 18-OCT-2010 uploaded, Accession No. EFP65990 , Definition: phosphonate dehydrogenase (NAD-dependent phosphite dehydrogenase) [Ralstonia sp. 5_7_47FAA] [retrieved on 27-APR-2012] Retrieved from the Internet: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/efp65990>	1-12
A	WOODYER R et al., Optimizing a biocatalyst for improved NAD(P)H regeneration: directed evolution of phosphite dehydrogenase, Combinatorial chemistry & high throughput screening, 2006, Vol. 9, No. 4, pp. 237-245	1-12
A	JOHANNES TW et al., Efficient Regeneration of NADPH Using an Engineered Phosphite Dehydrogenase, Biotechnol. Bioeng., 2007, Vol. 96, No. 1, pp. 18-26	1-12
A	GARCIA COSTAS AM et al., Purification and Characterization of a Novel Phosphorus-oxidizing Enzyme from Pseudomonas stutzeri WM88, J. Biol. Chem., 2001, Vol. 276, pp. 17429-17436	1-12
A	JOHANNES TW et al., Directed Evolution of a Thermostable Phosphite Dehydrogenase for NAD(P)H Regeneration, Appl. Environ. Microbiol., 2005, Vol. 71, No. 10, pp. 5728-5734	1-12
A	WOODYER R et al., Mechanistic investigation of a highly active phosphite dehydrogenase mutant and its application for NADPH regeneration, FEBS J., 2005, Vol. 272, No. 15, pp. 3816-3827	1-12
A	MCLACHLAN MJ et al., Further improvement of phosphite dehydrogenase thermostability by saturation mutagenesis, Biotechnology and Bioengineering, 2008, Vol. 99, Issue 2, pp. 268-274	1-12
A	VRTIS JM et al., Phosphite Dehydrogenase: A Versatile Cofactor-Regeneration Enzyme, Angew. Chem. Int. Ed., 2002, Vol. 41, No. 17, pp. 3257-3259	1-12
P, X	廣田隆一ほか, 亜リン酸デヒドロゲナーゼを用いた NADH 再生系の構築, 日本生物工学会大会講演要旨集, 2011. 08. 25, Vol. 63, p. 194	1-12
P, X	藤渕達也ほか, 亜リン酸デヒドロゲナーゼの取得と解析, 日本生物工学会大会講演要旨集, 2011. 08. 25, Vol. 63, p. 193	1-12

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
P, X	黒田章夫ほか, 還元型リン酸のバイオ利用のための新たな挑戦, 日本生物工学会大会講演要旨集, 2011.08.25, Vol.63, p.93	1-12
P, X	HIROTA R et al., Isolation and characterization of a soluble and thermostable phosphite dehydrogenase from <i>Ralstonia</i> sp. strain 4506, <i>J. Biosci. Bioeng.</i> , 2012.04, Vol.113, No.4, pp.445-450, Epub. 2011.12.23	1-12