

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2009年7月23日 (23.07.2009)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/091054 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) C12N 9/02 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) C12P 41/00 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/050601
- (22) 国際出願日: 2009年1月9日 (09.01.2009)
- (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2008-008062 2008年1月17日 (17.01.2008) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人慶應義塾 (KEIO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1088345 東京都港区三田二丁目15番45号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 宮本憲二 (MIYAMOTO, Kenji) [JP/JP]; 〒2238522 神奈川県横浜市港北区日吉三丁目14番1号慶應義塾大学理工学部内 Kanagawa (JP). 太田博道 (OHTA, Hiromichi) [JP/JP]; 〒2238522 神奈川県横浜市港北区日吉三丁目14番1号慶應義塾大学理工学部内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 平木祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門4丁目3番20号 神谷町MTビル19階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, 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 (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, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

(54) Title: NOVEL HYDROGEN PEROXIDE-FORMING NADH OXIDASE, AND DNA ENCODING THE SAME

(54) 発明の名称: 新規過酸化水素生成型NADHオキシダーゼ及びそれをコードするDNA

(57) Abstract: Disclosed is DNA encoding a novel NADH oxidase derived from a microorganism belonging to the genus *Brevibacterium* and having excellent pH stability and heat stability. Specifically disclosed is DNA encoding an NADH oxidase derived from a microorganism belonging to the genus *Brevibacterium* and selected from the following NADH oxidases (a) and (b): (a) an NADH oxidase comprising the amino acid sequence depicted in SEQ ID NO:18; and (b) an NADH oxidase which comprises an amino acid sequence having the deletion, substitution or addition of one or several amino acid residues in the amino acid sequence depicted in SEQ ID NO:18 and has an NADH oxidase activity.

(57) 要約: 本発明は、*Brevibacterium*属微生物由来のpH安定性及び熱安定性に優れた新規NADHオキシダーゼをコードするDNAの提供を目的とし、本発明は以下の(a)又は(b)の*Brevibacterium*属微生物由来のNADHオキシダーゼをコードするDNAである。(a) 配列番号18で表わされるアミノ酸配列を含むNADHオキシダーゼ(b) 配列番号18で表わされるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつNADHオキシダーゼ活性を有するNADHオキシダーゼ

WO 2009/091054 A1

明 細 書

新規過酸化水素生成型 NADH オキシダーゼ及びそれをコードする DNA

技術分野

本発明は、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) オキシダーゼ及びその製造法に関する。より詳しくは本発明は、酸素分子 (O_2) 存在下に NADH を基質特異的に酸化して過酸化水素 (H_2O_2) を生成し、*Brevibacterium* 属微生物から得られる NADH の測定等に有用な NADH オキシダーゼ、及びその製造法に関する。

背景技術

還元型補酵素 (NADH) を酸化型補酵素 (NAD^+) へと再生する酵素は、酸化還元酵素と組み合わせることにより各種アルコールを酸化することができることから非常に有用である。NADH オキシダーゼについて種々報告がある (特許文献 1 ~ 11 を参照)。

- 特許文献 1 特開平 7-163378 号公報
- 特許文献 2 特開 2003—116585 号公報
- 特許文献 3 国際公開第 W02004/011670 号パンフレット
- 特許文献 4 欧州特許公開第 1285962 号公報
- 特許文献 5 特開平 8-196281 号公報
- 特許文献 6 欧州特許公開第 623677 号公報
- 特許文献 7 特開平 5-344890 号公報
- 特許文献 8 特開平 5-84072 号公報
- 特許文献 9 特開平 4-365478 号公報
- 特許文献 10 欧州特許公開第 385415 号公報
- 特許文献 11 特開平 2-107186 号公報

発明の開示

本発明は、*Brevibacterium* 属微生物由来の pH 安定性及び熱安定性に優れた新

規 NADH オキシダーゼをコードする DNA の提供を目的とする。

種々の微生物から単離されたオキシダーゼは多数知られている。しかしながら、*Brevibacterium* 属微生物から単離された例はなかった。

一般的にアルコールの酸化反応を行う酸化還元酵素の最適 pH は弱アルカリ性の 9~10 程度である。従って、NAD⁺の再生を行う NADH オキシダーゼの最適 pH もこれと同じ範囲であることが望ましい。しかし、ラクトバチルス由来の NADH オキシダーゼ (デグサ特許) の最適 pH は 6 付近であり、再生系酵素として適当ではない。また、再生系酵素としては高い熱安定性が求められる。

本発明者らは、これらの優れた特性の酵素を得ようと鋭意検討を行なった。その結果、本発明者等が新たに分離した *Brevibacterium* 属微生物由来の NADH オキシダーゼが、アルカリ側に至適 pH を有し、また熱安定性も高いことを見出し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は以下の通りである。

[1] 下記の酵素学的性質を有する *Brevibacterium* 属微生物由来の NADH オキシダーゼ：

- (1) 酸素を受容体として NADH の酸化反応を触媒し、NAD⁺と過酸化水素を生成する；
- (2) 至適 pH は 8~10 付近である；
- (3) 70℃、1 時間の熱処理でも失活せず、80%以上の残存活性を有する；
- (4) 至適温度は 50~70℃である；
- (5) アンモニウム塩により活性化される；及び
- (6) 分子量は SDS-PAGE で測定した場合 50~60kDa である。

[2] さらに、以下の酵素学的性質を有する[1]の酵素：

- (7) NADPH に対する酸化活性は小さく、さらに、FAD や FMN による活性化は認められない；及び
- (8) K_m は約 0.022mM である。

[3] *Brevibacterium* sp. KU1309 (受託番号：FERM P-21008) 由来である[1]又は[2]の NADH オキシダーゼ。

[4] *Brevibacterium* 属微生物を培養し、培養物から NADH オキシダーゼを回収

することを含む、[1]～[3]のいずれかの NADH オキシダーゼの製造法。

[5] Brevibacterium 属微生物が、Brevibacterium sp. KU1309 (受託番号: FERM P-21008) である[4]の NADH オキシダーゼの製造法。

[6] 以下の(a)又は(b)の Brevibacterium 属微生物由来の NADH オキシダーゼ。

(a) 配列番号 18 で表わされるアミノ酸配列を含む NADH オキシダーゼ

(b) 配列番号 18 で表わされるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ NADH オキシダーゼ活性を有する NADH オキシダーゼ

[7] 以下の(a)又は(b)の Brevibacterium 属微生物由来の NADH オキシダーゼをコードする DNA。

(a) 配列番号 18 で表わされるアミノ酸配列を含む NADH オキシダーゼ

(b) 配列番号 18 で表わされるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ NADH オキシダーゼ活性を有する NADH オキシダーゼ

[8] 以下の(c)又は(d)の Brevibacterium 属微生物由来の NADH オキシダーゼをコードする DNA。

(c) 配列番号 17 で表わされる塩基配列を含む DNA

(d) 配列番号 17 で表わされる塩基配列を含む DNA と相補的な配列を含む DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、NADH オキシダーゼ活性を有するタンパク質をコードする DNA

[9] [8]の DNA を含有する発現ベクター。

[10] [9]の発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

[11] [10]の宿主細胞を DNA の発現可能な条件下で培養して、NADH オキシダーゼを産生させ、該 NADH オキシダーゼを回収することを含む NADH オキシダーゼの製造方法。

[12] 宿主細胞が大腸菌であって、[9]記載の発現ベクターをシャペロンプラズミドを共発現させることにより可溶性 NADH オキシダーゼを製造する、[11]の製造方法。

[13] [1]～[3]及び[6]のいずれかの NADH オキシダーゼを用いて、光学活性

マンデル酸又は D-フェニルアラニンを製造する方法。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2008-008062 号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図 1 A は、Butyl toyopearl カラムを用いた本発明の酵素の精製の結果を示す図である。

図 1 B は、本発明の酵素の SDS-PAGE の結果を示す図である。

図 2 は、本発明の酵素の pH プロフィールを示す図である。

図 3 は、本発明の酵素の pH 安定性を示す図である。

図 4 は、本発明の酵素の温度安定性を示す図である。

図 5 A は、各種塩の本発明の酵素に対する効果を示す図である。

図 5 B は、アンモニウム塩の本発明の酵素に対する効果を示す図である。

図 6 は、本発明の酵素の酸による阻害を示す図である。

図 7 は、本発明の酵素の Kinetics を示す図である。

図 8 A は、本発明の酵素による酸素分子の還元状態を決定する方法を示す図である。

図 8 B は、本発明の酵素による酸素分子の還元状態を示す図である。

図 9 A は、本発明の酵素とマンデル酸デヒドロゲナーゼのカップリング反応を示す図である。

図 9 B は、本発明の酵素と L-フェニルアラニンデヒドロゲナーゼのカップリング反応を示す図である。

図 10 は、本発明の酵素遺伝子のクローニングにおける縮重 PCR の結果を示す図である。

図 11 は、本発明の酵素遺伝子の断片を用いたサザンブロットティングの結果を示す図である。

図 12 は、本発明の酵素遺伝子を用いた印バース PCR の結果を示す図である。

図 13 A は、本発明の酵素遺伝子の塩基配列を示す図である。

図 13 B は、本発明の酵素遺伝子の塩基配列を示す図である(図 13 A の続き)。

図 1 3 C は、本発明の酵素遺伝子の塩基配列を示す図である（図 1 3 B の続き）。

図 1 4 は、本発明の酵素の組換え大腸菌を用いた発現のためのプラスミドの構造を示す図である。

図 1 5 は、シャペロンとの共発現による本発明の酵素の発現（可能性画分）を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明の酵素は、土壤中に生息する *Brevibacterium* 属微生物より単離することができる。*Brevibacterium* 属微生物の単離は公知の方法で行なうことができる。*Brevibacterium* 属微生物として、*Brevibacterium* sp. KU1309 が挙げられ、*Brevibacterium* sp. KU1309 は、独立行政法人産業技術総合研究所、特許生物寄託センター（日本国、茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6）に 2006 年 8 月 29 日付けで寄託されている（受託番号：FERM P-21008）。

Brevibacterium sp. KU1309 の菌学的性質は以下の通りである。

(a) 形態

(1) 細胞の大きさ： $0.8 \times 1.0 \sim 1.5 \mu\text{m}$ (24h)、 $0.8 \times 0.8 \sim 1.0 \mu\text{m}$ (72h) の桿菌。
Rod-coccus cycle あり。

(2) グラム染色性：陽性。

(3) 胞子の有無：なし。

(4) 運動性：なし。

(5) コロニー形態（培地；Nutrient Agar、培養時間 24 時間）：

円形、全縁滑らか、低凸状、光沢あり、黄色。

(6) 生育温度：37℃で+、45℃で-。

(7) カタラーゼ：陽性。

(8) オキシダーゼ：陰性。

(9) 酸/ガス産生（グルコース）：-/-。

(10) O/F テスト（グルコース）：-/-。

また、16S rDNA 塩基配列を配列番号 1 に示す。

上記の菌学的性質により、本発明の *Brevibacterium* sp. KU1309 は新種微生物で

あると同定された。

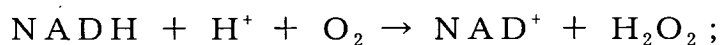
本発明の酵素は、上記微生物培養物より高いアルコール酸化活性を有する NADH オキシダーゼとして精製することができる。微生物の培養は公知の方法で行なうことができる。例えば、普通ブイヨン 20 g (極東製薬工業)、酵母エキス 5 g (極東製薬工業)を含む培地を用いて培養すればよい。上記微生物を 1～2 日培養し、菌体を破碎し菌体抽出液から本発明の酵素を精製することができる。本発明の酵素の精製も、公知の方法で行なうことができる。例えば、超音波破碎、ガラスビーズを用いる機械的破碎、フレンチプレス、界面活性剤、溶菌酵素などを用い菌体を破碎し抽出液を得て、さらに抽出液については硫酸や芒硝などの塩析法、塩化マグネシウムや塩化カルシウムなどの金属凝集法、プロタミンやエチレンイミンポリマーなどの凝集法、熱処理、さらにはイオン交換クロマトグラフィーなどにより精製することができる。例えば、Butyl toyopearl カラム (東ソー) を用いて行なえばよい。

本発明の酵素の酵素活性は NADH が NAD^+ へ酸化されると減少する 340nm の吸光度を吸光光度計で測定することにより測定することができる。NADH 1 μ モルを 1 分間あたりに酸化する酵素量を 1 単位 (U) とする。

本発明の酵素を NOX と呼ぶことがある。

本発明の NADH オキシダーゼは以下の性質を有する。

(1) 本発明の酵素は以下の反応式で酸素を受容体として NADH の酸化反応を触媒し、 NAD^+ と過酸化水素を生成する



(2) 本発明の酵素の至適 pH は 8～10 付近であり、酸化還元酵素と共にアルコールの酸化反応を行う際に、好適である；

(3) 本発明の酵素は温度安定性に優れており、70℃、1 時間の熱処理でも失活せず、80%以上、好ましくは 90%以上、さらにはほぼ 100%の残存活性を有する。この性質は、物質生産プロセスに於いて好適である；

(4) 本発明の酵素の至適温度は 50～70℃、好ましくは約 60℃である；

(5) 本発明の酵素はアンモニウム塩により活性化される。反応系を弱アルカリ性に保つ際にアンモニア水を用いると、酵素も活性化されるので好適である；

(6) 本発明の酵素は Zn^{2+} (39%)、 Cu^{2+} (42%)、 Ag^{+} (37%) などの柔らかい酸に阻害される；

(7) 本発明の酵素は、NADPH に対する酸化活性は小さく、さらに、FAD や FMN による活性化は認められない。NADPH を酸化できないという本酵素の特性は、NADH と NADPH が混在する生体試料中の NADH 量を選択的に測定できるという利点がある。；

(8) 本発明の酵素の K_m は 0.1mM 以下、好ましくは約 0.02mM 例えば 0.022mM である；

(9) 本発明の酵素を用いて NADH を 1 mol 酸化すると、1 mol の過酸化水素が生成する；及び

(10) 本発明の酵素はホモダイマーを形成し、サブユニットの分子量は SDS-PAGE で測定した場合、50kDa~60kDa、好ましくは約 57kDa である。ゲルろ過で想定したホモダイマーの分子量は約 102kDa である。また、アミノ酸配列から推定したサブユニットの分子量は約 49kDa である。

本発明の酵素をコードする DNA の塩基配列を図 3 及び配列番号 17 に示す。また、本発明の酵素のアミノ酸配列を図 3 及び配列番号 18 に示す。

本発明の酵素は、そのアミノ酸配列からなるタンパク質が NADH オキシダーゼ酵素活性を有する限り、当該アミノ酸配列において少なくとも 1 個、好ましくは 1 若しくは数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じてもよい。

例えば、配列番号 18 で表わされるアミノ酸配列の少なくとも 1 個、好ましくは 1 又は数個（例えば 1~10 個、さらに好ましくは 1~5 個）のアミノ酸が欠失してもよく、配列番号 18 で表わされるアミノ酸配列に少なくとも 1 個、好ましくは 1 又は数個（例えば 1~10 個、さらに好ましくは 1~5 個）のアミノ酸が付加してもよく、あるいは、配列番号 18 で表わされるアミノ酸配列の少なくとも 1 個、好ましくは 1 又は数個（例えば 1~10 個、さらに好ましくは 1~5 個）のアミノ酸が他のアミノ酸に置換してもよい。

このような配列番号 18 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配列として、配列番号 18 のアミノ酸配列と、BLAST (Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for

Biological Information (米国国立生物学情報センターの基本ローカルアラインメント検索ツール)) 等 (例えば、デフォルトすなわち初期設定のパラメータ) を用いて計算したときに、少なくとも 85%以上、好ましくは 90%以上、さらに好ましくは 95%以上、特に好ましくは 97%以上の相同性を有しているものが挙げられる。

このような配列番号 18 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配列を有するタンパク質は配列番号 18 のアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同一である。

また、配列番号 17 に表される塩基配列からなる DNA と相補的な配列からなる DNA と下記のストリンジентな条件下でハイブリダイズすることができる DNA であって NADH オキシダーゼ活性を有するタンパク質をコードする DNA も本発明の DNA に含まれる。すなわち、DNA を固定したフィルターを用いて、0.7~1.0M の NaCl 存在下、68°C でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2 倍濃度の SSC 溶液 (1 倍濃度の SSC とは 150mM NaCl、15mM クエン酸ナトリウムからなる) を用い、68°C で洗浄することにより同定することができる条件をいう。あるいは、サザンブロットティング法によりニトロセルロース膜上に DNA を転写、固定後、ハイブリダイゼーション緩衝液 [50% フォルムアミド、4×SSC、50mM HEPES (pH7.0)、10×デンハルト (Denhardt's) 溶液、100 μg/ml サケ精子 DNA] 中で 42°C で一晩反応させることによりハイブリッドを形成することができる DNA である。

さらに、上記 DNA に対する RNA、又は該 RNA とストリンジентな条件下でハイブリダイズすることができる RNA であって NADH オキシダーゼ活性を有するタンパク質をコードする RNA も本発明に含まれる。

本発明の組換えベクターは、適当なベクターに本発明の DNA を連結(挿入)することにより得ることができる。本発明の DNA を挿入するためのベクターは、細菌、酵母又は動物細胞等の宿主細胞中で複製可能なものであれば特に限定されず、例えば、プラスミド DNA、ファージ DNA 等が挙げられる。発現ベクターの構築に用いられるベクター DNA は、広く普及した入手の容易なものが用いられる。例えば、pET ベクター、pQE ベクター、pCold ベクター、pUC19 ベクター等が挙げられる。

本発明の発現ベクターの構築方法は、特に限定されるものではなく常法により

行うことができる。

本発明の発現ベクターで形質転換された宿主細胞は、本発明の DNA を発現し得るものであれば特に制限されないが、例えば、細菌としては大腸菌、枯草菌等が、酵母としてはサッカロマイセス・セレビィシエ等が、動物細胞としては、チャイニーズ・ハムスター・卵巣 (CHO) 細胞、サル COS 細胞、マウス線維芽細胞等が挙げられる。

本発明は、上記 DNA を含む宿主細胞を DNA の発現可能な条件下で培養して、NADH オキシダーゼを産生させ、該 NADH オキシダーゼを回収することを含む NADH オキシダーゼの製造方法を包含する。

本発明の酵素を大腸菌で大量に発現させた場合、タンパク質のフォールディングがうまくいかず、不溶性画分に封入体として生産されやすい。そこで、大腸菌においてシャペロンプラスミドと共発現させ、シャペロンによる可溶化を促進させることが好ましい。シャペロンプラスミドとして、pGro7、pKJE7、pTf16 等が挙げられる。

宿主細胞により産生された NADH オキシダーゼは、例えばゲル濾過クロマトグラフィー、限外濾過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、クロマトフォカシング、等電点電気泳動法、ゲル電気泳動法等の公知の精製法を単独又は組み合わせて精製することができる。

本発明の酵素は、酸化反応に必要な還元型補酵素 (NADH) を酸化型補酵素 (NAD⁺) へと再生することができる。本発明の酵素を他の酸化還元酵素と組合せることにより各種アルコールを酸化することができる。また、例えば、マンデル酸デヒドロゲナーゼや L-フェニルアラニンデヒドロゲナーゼと組合せ、カップリング反応を行なわせることにより光学活性 (S)-マンデル酸や光学活性 D-フェニルアラニンを製造することができる。また、本発明の酵素は、H₂O₂ の定量法と組み合わせて NADH が関与する各種脱水素酵素の活性測定及び NAD を補酵素とする各種脱水素酵素の基質量の測定に利用できる。また、バイオ燃料電池や酵素診断薬への応用も期待される。

本発明を以下の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

実施例 1 酵素の精製

(1) 細胞の培養

Brevibacterium 属微生物 Brevibacterium sp. KU1309 を土壌から単離し、以下の方法で培養した。単離した Brevibacterium sp. KU1309 は、独立行政法人産業技術総合研究所、特許生物寄託センター（日本国、茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6）に 2006 年 8 月 29 日付けで寄託した（受託番号：FERM P-21008）。

培地は 1 リットルあたり、普通ブイヨン 20 g（極東製薬工業）、酵母エキス 5 g（極東製薬工業）を溶かしたものを 2 M 水酸化ナトリウムで pH7.0 に調整し 120℃、20 分加熱滅菌したものをを用いた。

培地 10ml の入った試験管に、固体培地上の Brevibacterium を白金耳で植菌し、30℃で 24 時間、振とう培養した。この細胞懸濁液 1 ml を培地 100ml の入った 500ml 坂口フラスコに加え、30℃で 24 時間、振とう培養を行い、遠心分離により細胞を回収した。得られた細胞はリン酸緩衝溶液で洗浄し、再び遠心分離により細胞を回収した。これは -20℃でかなり長期保存することができる。

(2) 酵素精製

無細胞抽出液の調製

湿潤した細胞 (20g) を 100mM リン酸緩衝溶液 (pH7.0) 5 mM 2-メルカプトエタノールに懸濁し、Dyno-mill (Willy A. Bachofen Co.) で破碎した。この混合物を遠心分離し、上澄みを回収し、これを無細胞抽出液とした。

(3) 酵素活性の測定

酵素活性は、NADH が NAD⁺へ酸化されると減少する 340nm の吸光度を吸光度計で測定して評価した。反応は 0.1mM NADH、100mM トリス塩酸 (pH8.8)、500mM 硫酸アンモニウムに酵素溶液を加えて行った。1 ユニットは NADH 1 μモルを 1 分間あたりに酸化する酵素量として定義した。

(4) 硫安分画

無細胞抽出液を 0℃で攪拌しながら、硫酸アンモニウムを 35%飽和の濃度となるまで 15 分間かけて少しずつ添加した。その後さらに 1 時間攪拌した。遠心分離により沈殿を除去し、上澄みに 65%飽和となるまで硫酸アンモニウムを 15 分間かけて加えた。加え終わってから 1 時間攪拌した後、遠心分離により沈殿を回収

した。この沈殿を 10mM リン酸緩衝溶液、5 mM 2-メルカプトエタノール、30%飽和硫酸アンモニウムを含む 10mM リン酸緩衝溶液 (pH7.0) に溶解した。

(5) クロマトグラフィー

5 mM 2-メルカプトエタノール、飽和 30%硫酸アンモニウムを含む 10mM リン酸緩衝溶液 (=緩衝溶液 A) で平衡化した Phenyl toyopearl カラム (東ソー、カラム体積 150ml) に試料をのせた。Econo Gradient Pump (Bio Rad) を用いてクロマトグラフィーを行った (流速 1.5ml/min)。450ml の緩衝溶液 A で洗浄したのち、450ml の緩衝溶液 A と 450ml の 5 mM 2-メルカプトエタノール、20%飽和硫酸アンモニウムを含む 10mM リン酸緩衝溶液 B (pH7.0) の硫酸アンモニウム直線勾配でタンパク質を溶出させた。各フラクションの酵素活性を調べ、活性フラクションを集めて、10mM リン酸緩衝溶液 (pH7.0) に透析した。このフラクションプールを 5 mM 2-メルカプトエタノール、200mM NaCl を含む 10mM リン酸緩衝溶液 (pH7.0) (緩衝溶液 C) で平衡化された DEAE toyopearl カラム (東ソー、カラム体積 50ml) にのせた。150ml の緩衝溶液 C で洗浄後、150ml の緩衝溶液 C と 150ml の 5 mM 2-メルカプトエタノール、300mM NaCl を含む 10mM リン酸緩衝溶液 (pH7.0) (=緩衝溶液 D) による、NaCl 直線勾配でタンパク質を溶出した (流速 1 ml/min)。これらの中から活性のあるフラクションを回収し、30%飽和となるまで硫酸アンモニウムを加えた。この溶液を、5 mM 2-メルカプトエタノール、30%飽和硫酸アンモニウムを含む 10mM リン酸緩衝溶液 (pH7.0) (=緩衝溶液 E) で平衡化した Butyl toyopearl カラム (東ソー、カラム体積 10ml) にのせた。30ml の緩衝溶液 E で洗浄後、30ml の緩衝溶液 E と 30ml の 5 mM 2-メルカプトエタノール、15%飽和硫酸アンモニウムを含む 10mM リン酸緩衝溶液 (pH7.0) (=緩衝溶液 F) の硫酸アンモニウム直線勾配でタンパク質を溶出した (流速 1 ml/min)。活性なフラクションを回収し、10mM リン酸緩衝溶液 (pH7.0) に透析した。Butyl toyopearl カラムによる各フラクションの酵素活性を図 1 B に示す。図 1 A に示すように単一ピークが認められた。さらに、精製後に SDS-PAGE を行った。CBB による染色では 50kDa 付近 (56.8kDa) に均一なバンドを確認することができた (図 1 A)。またゲルろ過クロマトグラフィーから非変性状態での分子量は 102kDa であったことから 2 量体として存在する酵素であることがわかった。また精製した酵素の溶液は黄色透明で

あったことからフラビン酵素であると考えられる。

精製過程における酵素活性、収率を次の表 1 にまとめた。

表 1

精製過程における酵素活性、収率

	体積 (ml)	総活性 (U)	総タンパク量 (mg)	比活性 (U/mg)	精製度	収率 (%)
無細胞抽出液	205	69.09	800.98	0.086	1.00	100
硫酸分画	78	33.31	466.69	0.071	0.83	48
Phenyl toyopearl	75	15.68	16.55	0.947	10.98	23
DEAE toyopearl	42	9.73	2.31	4.212	48.83	14
Butyl toyopearl	12	7.04	1.35	5.215	60.46	10

実施例 2 Brevibacterium sp. から単離した NADH オキシダーゼの酵素学的性質

(1) pH 依存性

pH5.5~11.5 の範囲で酸化反応の最適 pH を測定した。緩衝溶液は各 pH 範囲に適した緩衝溶液、すなわち MES (pH5.5~6.5)、MOPS (pH6.5~7.4)、HEPES (pH7.0~8.0)、Tris (pH7.5~8.8)、グリシン (pH8.8~10.4)、CAPS (pH9.4~10.8)、リン酸ナトリウム (pH10.54~11.52) を用いた。各 pH での相対反応速度を図 2 にまとめた。

本酵素は、アルカリ側 (pH8.5~10) に最適 pH を有することが判明した。

(2) pH 安定性

酵素を pH4.5~11.5 の各 pH で 70°C、1 時間インキュベートし、その後の残存活性を測定した。緩衝溶液はクエン酸 (pH4.7)、MES (pH5.5、6.3)、MOPS (pH6.6、7.4)、Tris (pH7.4、8.5)、TAPS (pH8.4、9.2)、CAPS (pH9.4、10.2)、リン酸ナトリウム (pH10.5、11.5) を用いた。

70°C の加熱を行っていない状態を 100% として残存活性をプロットしたのが図 3 である。

図に示すように pH 6~10 の広い pH 範囲で安定であった。

(3) 熱安定性

MOPS 緩衝溶液 (pH6.6) 中での熱に対する安定性の検討を行った。各温度で 1 時間インキュベートし、その後の活性を室温で測定した。これを図 4 のグラフの(◆)

で示した。また各温度 (30°C~70°C) で酵素活性を測定し、これを図 4 のグラフに (□) で示した。

図に示すように 70°C、1 時間のインキュベートに対してほぼ 100% 安定であった。

(4) 塩の効果

各種塩を加えて反応を行い、340nm の吸光度を測定し反応速度を決定した。図 5A に各種塩の酵素活性に対する効果を示す。このようにアンモニウム塩を加えることに酵素活性は上昇することがわかった。そこで、アンモニウム塩濃度の酵素活性に対する影響を調べた。方法は、硫酸アンモニウムを 0M から 4.35M の各濃度存在下で反応を行い、反応速度の相対値を算出した。図 5B にアンモニウム塩の酵素活性に対する効果を示す。

図に示すように、活性にはアンモニウム塩が必要であり、活性が最大となるアンモニウム塩濃度 ($[\text{NH}_4^+]$) は、3.0M であった。

(5) 阻害実験

酵素溶液を 100mM Tris-HCl (pH8.8) に加え、さらに阻害剤を終濃度 1mM となるように加え、3 分間室温でインキュベートした。その後、NADH を 10 μM 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を 500mM となるように加え、340nm の吸光度を測定することにより、反応速度を決定した。

図 6 に相対活性値を示す。図 6 に示すように、 Zn^{2+} (39%)、 Cu^{2+} (42%)、 Ag^+ (37%) などの柔らかい酸に阻害された。

(6) 速度論的解析

速度論的解析は NADH 濃度を 10 μM から 100 μM の間で反応速度を測定し、この値から Lineweaver-Burk プロットを作成した。反応は次のように行った。反応液 {NOX; 0.28ug/ml、NADH; 10 μM -100 μM 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 500mM、Tris-HCl; 100mM (pH8.8)} を吸光光度計用セルに入れ、340nm の吸光度を測定することにより、反応速度を決定した。

図 7 に Lineweaver-Burk プロットの結果を示す。

表 2 に NADH に対する Kinetics を示す。

表 2

NADHに対するKinetics

Km	(mM)	0.022
Vmax	(Unit/mg)	8.86
Kcat*	(1/sec)	15.01
Kcat/Km		677.87

*分子量は101.68kDaとして計算した。

表 3 に基質及び Cofactor による活性を示す。

表 3

基質	補因子	相対活性 (%)
NADH	NONE	100
	1 mM FAD	101
	1 mM FMN	104
NADPH		2

本発明の酵素の Km は 0.022mM とかなり小さかった。また、NADPH に対する酸化活性は小さかった。さらに、FAD や FMN による活性化は認められなかった。

(7) 酵素による酸素分子の還元状態

NOX は H₂O 副生型と H₂O₂ 副生型に分類される。図 8A に示すアッセイ法を用いて H₂O₂ の生成確認と定量を行った。

まず、既知濃度の過酸化水素と o-ジアニシジン、ペルオキシダーゼを用いて反応を行い、[H₂O₂] vs Abs460 の検量線を作成した。これによって得られたプロットが、図 8B の (◆) である。つづいて、実際に NOX での NADH 酸化反応を行い、反応後に生成した過酸化水素濃度を測定した。すなわち、NOX による酸化反応を NADH 濃度を 75 μM、100 μM、150 μM で行い、十分な反応時間で反応を完了した。反応の完了は吸光度計により確認した。この反応液 50 μl を、o-ジアニシジン、ペルオキシダーゼを含む 100mM のリン酸緩衝溶液 (pH7.0) に加え、吸光度を測定した。これにより得られたプロットが図 8B の (□) で示した。一番左から、

NADH 濃度が 75、100 及び 150 μ M の時の Abs460 である。これは $[H_2O_2]$ 濃度と同じ値をとっていることがわかる。

このことから、 H_2O_2 の生成が確認できた。また NADH を 1 mol 酸化すると、1 mol の過酸化水素が生成することがわかった。

実施例 3 NADH オキシダーゼの利用例

(i) マンデル酸デヒドロゲナーゼとの併用による光学活性マンデル酸の調製

Enterococcus faecalis IAM 10071 からのマンデル酸デヒドロゲナーゼ (Tamura, Y., et al. 2002. Appl. Environ. Microbiol. 68:957-957) と Brevibacterium sp. からの NADH オキシダーゼを組み合わせることで、マンデル酸の酸化を行った。

マンデル酸デヒドロゲナーゼは簡易精製して用いた。以下に方法を示す。

MRS 培地 10ml の入った試験管に Enterococcus faecalis IAM 10071 を固体培地から白金耳を用いて植菌し、30°C で 24 時間振とう培養した。この培養液を MRS 培地 1.2 リットルの入った 5 リットルの三角フラスコ (バッフルつき) に全量移し、30°C で 48 時間、旋回培養した。培養液から遠心分離によって細胞を回収し、湿潤細胞 9.2g を得た。これを 100mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.5)、5 mM 2-メルカプトエタノールに懸濁し、ミルによって細胞を破碎した。遠心分離によって未破碎菌体を除去し、無細胞抽出液を得た。マンデル酸デヒドロゲナーゼの酵素活性はマンデル酸の酸化に伴い生成する NADH の 340nm の吸光度を吸光光度計により測定した。反応は 50mM ラセミ体マンデル酸、1 mM NAD^+ 、100mM トリス塩酸 (pH8.8) に酵素溶液を加えて行った。25%~60%飽和の硫酸アンモニウムで沈殿したタンパクを遠心分離によって回収し、10mM トリス塩酸緩衝溶液 (pH7.5) に溶解し、同緩衝液で透析した。この酵素溶液を 5 mM 2-メルカプトエタノール、100mM NaCl を含む 10mM トリス塩酸 (pH7.5) で平衡化した DEAE toyopearl カラム (カラム体積 50ml、流速 1 ml/min) にのせた。平衡化した緩衝溶液で洗浄後、150ml の平衡化した緩衝溶液と 150ml の 5mM 2-メルカプトエタノール、200mM NaCl を含む 10mM トリス塩酸 (pH7.5)、を用いて直線勾配によりタンパク質を溶出した。このフラクションから活性画分を集め、Amicon Ultra (MILLI PORE) により濃縮してマンデル酸デヒドロゲナーゼの部分精製酵素を得た。

マンデル酸デヒドロゲナーゼと NADH オキシダーゼの併用反応は次の組成で行

った。2 mM ラセミ体マンデル酸、0.1mM NAD⁺、250mM 硫酸アンモニウム、100mM トリス塩酸(pH 8.8)、NADH オキシダーゼ 0.1U/ml、マンデル酸デヒドロゲナーゼ 0.1U/ml の混合物を 30°C でインキュベートし、HPLC によりマンデル酸の光学純度を決定した。[HPLC 条件：CHIRALCEL OD-H (ダイセル化学工業)、展開相 ヘキサン/イソプロピルアルコール=19/1 0.2%トリフルオロ酢酸、流速 0.5ml/min、検出 UV 254nm、保持時間(S)-マンデル酸 22.14min, (R)-マンデル酸 27.23min]

本発明の酵素とマンデル酸デヒドロゲナーゼのカップリング反応の反応機構を図 9A に示す。

この結果、48 時間後には R 体のマンデル酸は全て酸化され、光学活性(S)-マンデル酸が得られた。

(ii)L-フェニルアラニンデヒドロゲナーゼとの併用による D-フェニルアラニンの調製

L-フェニルアラニンデヒドロゲナーゼは和光純薬より購入したものをを用いた。

反応は次の組成で行った。2.5mM DL フェニルアラニン、0.1mM NAD⁺、10mM 硫酸アンモニウム、100mM CAPS (pH 10.2)、NADH オキシダーゼ 0.2U/ml、L-フェニルアラニンデヒドロゲナーゼ 0.2U/ml の混合物を 30°C でインキュベートし、HPLC によって系中のフェニルアラニンの光学純度を調べた。[HPLC 条件：Crownpak CR(+) 展開相 5.7%過塩素酸、流速 0.5ml/min、検出 UV200nm、保持時間 D-フェニルアラニン 18.5min、L-フェニルアラニン 25.1min]

本発明の酵素と L-フェニルアラニンデヒドロゲナーゼのカップリング反応の反応機構を図 9B に示す。

この結果、48 時間後には L 体のフェニルアラニンは全て酸化され、光学活性 D-フェニルアラニンが得られた。

このように、*Brevibacterium* sp. からの NADH オキシダーゼは広い pH 適性（特に弱アルカリ側）と高い安定性を有しているため、非常に汎用性が高い。

実施例 4 酵素遺伝子のクローニング

単離した酵素遺伝子のクローニングは、N 末端アミノ酸配列と内部アミノ酸配列を解析後、縮重プライマーを用いた PCR で断片を獲得しインバース PCR により全長遺伝子配列のクローニングを行った。以下に詳細を示す。

N 末端アミノ酸配列

実施例 1 に記載の方法で精製した酵素について SDS-PAGE を行った。アクリルアミドゲルからセミドライプロットング装置によって PVDF 膜に転写した。この膜を CBB 染色して、目的のバンドをプロテインシーケンサーを用いて解析したところ、本酵素の N 末端は XDELTYDLVVLGGGTGG (配列番号 2) であることが分かった。

内部アミノ酸配列

実施例 1 に記載の方法で精製した酵素について SDS-PAGE を行った。SDS-PAGE を CBB 染色し目的のバンドを切り出し、ゲル内消化を行った。はじめはリジルエンドペプチダーゼによる消化を試みたが、なかなかペプチド断片に分解することができず HPLC ではあまり切断されていない大きな断片のものと思われるピークが観察された。そこでトリプシンを用いて消化を行うこととした。トリプシンはリジンとアルギニンの C 末端を切断する酵素なので、リジルエンドペプチダーゼを用いた場合より、細かく断片に消化できると期待した。この結果、断片化することに成功しプロテインシーケンサーによって解析したところ、GPVTEGFGFEEQGIPMDR (配列番号 3) であることがわかった。

縮重 PCR

得られた N 末端及び内部配列をもとに以下のような縮重したセンスプライマー (F01, F02) とアンチセンスプライマー (R01, R02) を設計した。

DELTYDLVVL (配列番号 4) に対応した NOX degenerate primer F01

5' - GAYGARYTIACITAYGAYYTIGTIGTNYT-3' (配列番号 5)

VLGGGTGGY (配列番号 6) に対応した NOX degenerate primer F02

5' -AARYTIGGNGGIGGNACIGGIGGNTA-3' (配列番号 7)

PVTEGFGFE (配列番号 8) に対応した NOX degenerate primer R01

5' -TCRAANCCRAAICCYTCIGTNACNGG-3' (配列番号 9)

TEGFGFEEQ (配列番号 10) に対応した NOX degenerate primer R02

5' -TCCATIGGDATNCCYTGTCYTCRAA-3' (配列番号 11)

反応は表 4 に示す組成及び方法でプライマーを (F01×R01)、(F01×R02)、(F02×R01)、(F02×R02) と組み合わせて行った。初めはゲノム DNA をテンプレートとして試みたが増幅が安定せず、回収量が少なかった。そこで EcoR I 消化物、Pst

I 消化物を用いて反応を行ったところ、EcoR I 消化物で行った場合に図 10 のレーン 5 に示すように 800b. p. 程度の DNA フラグメントを得ることができた。この際、縮重度が上がり過ぎないようにイノシンを用いた。図 10 中レーン 1～4 はテンプレートに PstI 消化物を用いた場合の結果であり、レーン 5 からはテンプレートに EcoRI 消化物を用いた場合の結果である。プライマーの組合せは、レーン 1 及び 5 が F01×R01、レーン 2 及び 6 が F01×R02、レーン 3 及び 7 が F02×R01、レーン 4 及び 8 が F02×R02 である。

表 4

反応液組成		サーマルサイクル
10×ExTaq buffer	10 μ L	1, 94 °C 2 min
dNTP mix	8 μ L	2, 94 °C 30 sec
100 μ M F primer	2 μ L	3, 40 °C 30 sec
100 μ M R primer	2 μ L	4, 72 °C 70 sec
Genome DNA digested by EcoRI	1 μ L	2に戻って 34 サイクル
Ex Taq	0.5 μ L	
DW	up to 100 μ L	

得られた DNA 断片を精製し pGEM (登録商標) T-easy ベクターへライゲーションした (16°C, 30 min)。XL10-Gold (Z コンピテントセル) を形質転換しアンピシリンを含む LB 寒天培地に塗布した。Colony direct PCR によりインサートの確認を行い、陽性クローンからプラスミド (pGEMNOXin) を抽出した。得られたプラスミドに対し M13 プライマーを用いてシーケンス解析を行い、825b. p. の内部遺伝子配列を同定した。

サザンハイブリダイゼーション

得られた遺伝子断片を用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。pGEMNOXin から Not I を用いて酵素の内部配列を切り出し、精製してこれをプローブとしてゲノミックサザンハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションは 55°C で終夜振とうすることで行った。また一次洗浄も 55°C で行った。この結果を図 11 に示す。図 11 (a) は UV によるゲノム消化物の検出の結果を示し、図 11 (b) は酵素発行による検出の結果を示す。用いたサンプルは、レーン 1～6

でそれぞれ Sal I 消化物、Sac I 消化物、Hinc II 消化物、Xho I 消化物、Bgl I 消化物、Sma I 消化物であり、M はマーカーである。Sal I 消化物中に約 3000b. p. 程度のフラグメントが検出された。

インバース PCR

ゲノム DNA の Sal I 消化物をアガロースゲルで分離し 2.0kb. p. ~3.4kb. p. の部分を切り出し精製し TE に溶解し DNA 断片溶液 (20ng/ μ L) を得た。この溶液 20 μ L に水 80 μ L と TOYOBO 社製 2 \times Ligation high を 100 μ L 加え 16 $^{\circ}$ C で終夜静置した。この溶液を精製して 50 μ L の TE 溶液としてインバース PCR に用いた。インバース PCR には以下のプライマーを組み合わせて用いた。

NOX inverse primer F01; 5' -ACGGTGCAGGCAGGTGCCTCCCACCTTGTC-3' (配列番号 1
2)

NOX inverse primer F02; 5' -GCGTTCGATCAAAGCGACCTTCATGTGCGAG-3' (配列番号 1
3)

NOX inverse primer R01; 5' -GGCGTCATGTTCAAGGGCGTCGAAGAGACG-3' (配列番号 1
4)

NOX inverse primer R02; 5' -GCCGACGGGGTCAAGGTCCTCTCGAAGAC-3' (配列番号 1
5)

反応は表 5 に示す組成及び方法で行った。

表 5

反応液組成		サーマルサイクル
10 \times ExTaq buffer	10 μ L	1, 94 $^{\circ}$ C 2 min
dNTP mix	8 μ L	2, 94 $^{\circ}$ C 30 sec
100 μ M NOX inverse primer F	1 μ L	3, 45 $^{\circ}$ C 30 sec
100 μ M NOX inverse primer R	1 μ L	4, 72 $^{\circ}$ C 5 min
template	20 μ L	2 に戻って 34 サイクル
Ex Taq	0.5 μ L	
DW	up to 100 μ L	

結果を図 1 2 に示す。図 1 2 に示すように、これによりプライマー (F02 \times R02) の組み合わせで 2.6kb. p. 程度の DNA 断片を得た。この断片をアガロースゲル電気

泳動によって切り出し精製した。この PCR 産物を NOX inverse primer F02, NOX inverse primer R02 を用いてシーケンス解析を行い、N 末端の縮重部分と 1300b. p. までの遺伝子配列を解析した。C 末端まで解析するために以下のプライマーを用いて nox の全長遺伝子を同定した。

NOX sequence 2; 5' -TCCGTCGGACTCTCCTCTGCACAG-3' (配列番号 16)

このフラグメントに関してシーケンスを解析することで、精製した酵素をコードする全塩基配列を取得した。遺伝子配列解析から該酵素はアミノ酸 462 残基からなる 48909.99Dalton の酵素であることがわかった。配列解析の結果を図 13A~C に示す。また、塩基配列を配列番号 17 に、アミノ酸配列を配列番号 18 に示す。

実施例 5 Brevibacterium sp. KU1309 由来 NADH オキシダーゼの組み換え大腸菌を用いた大量発現系の構築

大腸菌を用いて本酵素の大量発現に関する検討を行った。

遺伝子の調製

Brevibacterium sp. KU1309 ゲノムをテンプレートとして、プライマーを以下のように設計した。N 末端のバリン(GTG)はメチオニン(ATG)に換えて設計した。

NOXForNde01: 5' -GGAATTCCCATATGAGTGACGAATTGACCTACGACCTT-3' (配列番号 19)

下線は Nde I サイト)

NOXRevEco01: 5' -GGAATTCTTATGAGTGAAGTGCAGGGGTTTGCC-3' (配列番号 20)

(下線は EcoR I, 斜体は終止コドン)

このプライマーと KU1309 のゲノム DNA(Sal I)消化物をテンプレートとして表 6 に示す組成及び方法で PCR を行った。

表 6

反応液組成		サーマルサイクル
10×ExTaq buffer	10 μ L	1, 94 °C 2 Min
dNTP mix	8 μ L	2, 94 °C 30 Sec
100 μ M NOXForNde01	1 μ L	3, 50 °C 30 Sec
100 μ M NOXRevEco01	1 μ L	4, 72 °C 2.5 Min
Template	0.5 μ L	2に戻って 34 サイクル
Ex Taq	0.5 μ L	
DW	Up to 100 μ L	

ベクターの構築

得られた遺伝子 (nox 遺伝子) を用いて pET21-b(+) と pCold I I I に組み込んだプラスミド pET21BNOX, pCBNOX を作成した。pET21BNOX は T7 プロモータ制御下に野生型 BNOX を発現するように挿入した。pCBNOX はコールドショックプロモーター制御下に TEE 融合型 BNOX を発現するように挿入した (図 1 4)。

発現検討

構築したプラスミドベクターを用いて、様々な宿主に関して発現検討を行った。発現は 37°C で培養後、IPTG を添加後、数時間誘導することで行った。得られた菌体を超音波で破碎し、その上清中の NADH 酸化活性を測定した。IPTG を添加していない場合でも、大腸菌自体が NOX 活性を有しているため、IPTG の非添加時と比べて有意な差のある系を検討することとした。この結果を表 7 に示す。

表 7

ベクター	宿主	IPTG (mM)	温度 (°C)	発現	比活性* (U/mg)
pET21BNOX	BL21(DE3)	1	25	○	0.036
		0.5	16	○	0.028
		0.3	10	○	0.026
	BL21star(DE3)pLysS	0.5	15	×	0
	Tuner (DE3)	0.3	25	○	0
	Rosetta-gamiB(DE3)	0.3	25	×	0

* IPTG 添加時と非添加時の差から算出した。

表 7 に示すように、一部の宿主で大量に発現するものの、ほとんどが封入体を形成してしまった。そこで、この問題を解決するため、シャペロンプラスミドを導入した大腸菌を用いて発現してみることにした。大腸菌は先の検討の結果で、可溶性活性酵素として発現していた BL21(DE3) を用いることにした。この結果を表 8 に示す。また、SDS-PAGE の結果を図 15 に示す。図 15 中、レーン 1 は pGro7 との発現 (誘導あり)、レーン 2 は pGro7 との発現 (誘導なし)、レーン 3 は pKJE7 との発現 (誘導あり)、レーン 4 は pKJE7 との発現 (誘導なし) を示す。

表 8

ベクター	宿主	シャペロン プラスミド	発現	比活性 (U/mg)
pET21BNOX	BL21(DE3)	pGro7	○	0.073
		pKJE7	○	0.076
		pG-KJE8	△	0
		pTf16	○	0.0017

表 8 に示すように、pGro7 や pKJE7 を用いた場合に活性の向上が見られた。また図 15 に示すように、可溶性画分に目視できる程度の発現に成功した。

産業上の利用可能性

本発明の NADH オキシダーゼは、pH 安定性及び熱安定性に優れており、必要不可欠な補酵素再生系酵素として非常に有用であり高効率な反応プロセスを実現できる。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

請求の範囲

1. 下記の酵素学的性質を有する *Brevibacterium* 属微生物由来の NADH オキシダーゼ:

(1) 酸素を受容体として NADH の酸化反応を触媒し、 NAD^+ と過酸化水素を生成する;

(2) 至適 pH は 8 ~ 10 付近である;

(3) 70°C、1 時間の熱処理でも失活せず、80% 以上の残存活性を有する;

(4) 至適温度は 50 ~ 70°C である;

(5) アンモニウム塩により活性化される; 及び

(6) 分子量は SDS-PAGE で測定した場合 50 ~ 60kDa である。

2. さらに、以下の酵素学的性質を有する請求項 1 記載の酵素:

(7) NADPH に対する酸化活性は小さく、さらに、FAD や FMN による活性化は認められない; 及び

(8) K_m は約 0.022mM である。

3. *Brevibacterium* sp. KU1309 (受託番号: FERM P-21008) 由来である請求項 1 又は 2 に記載の NADH オキシダーゼ。

4. *Brevibacterium* 属微生物を培養し、培養物から NADH オキシダーゼを回収することを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の NADH オキシダーゼの製造法。

5. *Brevibacterium* 属微生物が、*Brevibacterium* sp. KU1309 (受託番号: FERM P-21008) である請求項 4 記載の NADH オキシダーゼの製造法。

6. 以下の (a) 又は (b) の *Brevibacterium* 属微生物由来の NADH オキシダーゼ。

(a) 配列番号 18 で表わされるアミノ酸配列を含む NADH オキシダーゼ

(b) 配列番号 18 で表わされるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ NADH オキシダーゼ活性を有する NADH オキシダーゼ

7. 以下の (a) 又は (b) の *Brevibacterium* 属微生物由来の NADH オキシダーゼをコードする DNA。

- (a) 配列番号 18 で表わされるアミノ酸配列を含む NADH オキシダーゼ
- (b) 配列番号 18 で表わされるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ NADH オキシダーゼ活性を有する NADH オキシダーゼ

8. 以下の(c)又は(d)の *Brevibacterium* 属微生物由来の NADH オキシダーゼをコードする DNA。

(c) 配列番号 17 で表わされる塩基配列を含む DNA

(d) 配列番号 17 で表わされる塩基配列を含む DNA と相補的な配列を含む DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、NADH オキシダーゼ活性を有するタンパク質をコードする DNA

9. 請求項 7 又は 8 に記載の DNA を含有する発現ベクター。

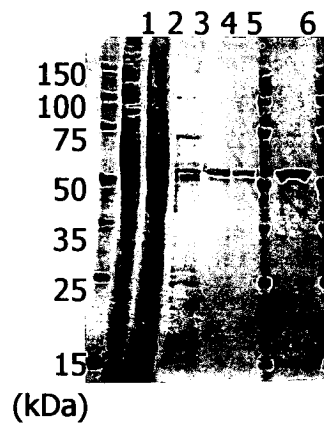
10. 請求項 9 記載の発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

11. 請求項 10 記載の宿主細胞を DNA の発現可能な条件下で培養して、NADH オキシダーゼを産生させ、該 NADH オキシダーゼを回収することを含む NADH オキシダーゼの製造方法。

12. 宿主細胞が大腸菌であって、請求項 9 記載の発現ベクターをシャペロンプラスミドを共発現させることにより可溶性 NADH オキシダーゼを製造する、請求項 11 記載の製造方法。

13. 請求項 1～3 及び 6 のいずれか 1 項に記載の NADH オキシダーゼを用いて、光学活性マンデル酸又は D-フェニルアラニンを製造する方法。

図 1 A



一番左端はperfect protein marker (NOVAGEN)
1, 無細胞抽出液 2, 硫酸分画 3, Phenyl toyopearl 4, DEAE toyopearl
5, Butyl toyopearl 6, Butyl toyopearl (量を増やしたもの)

図 1 B

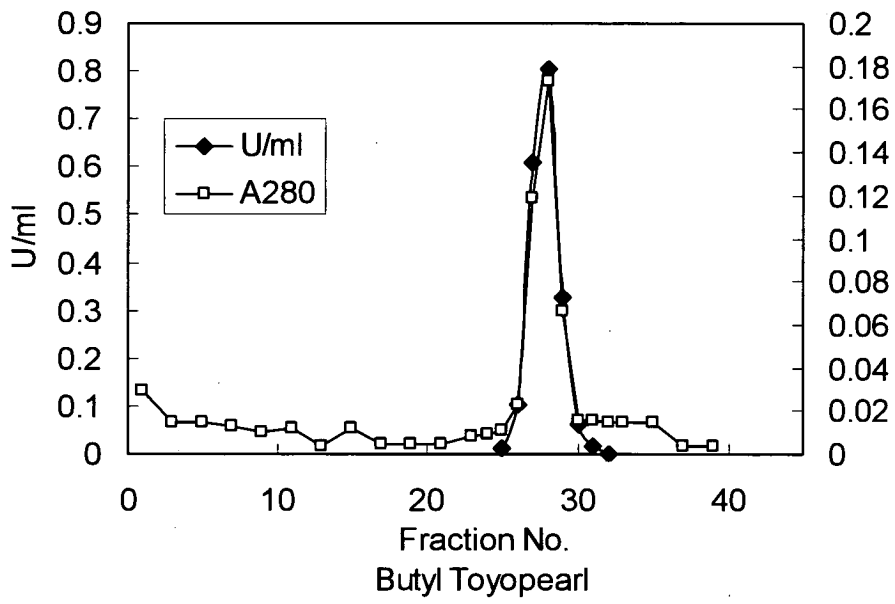


図 2

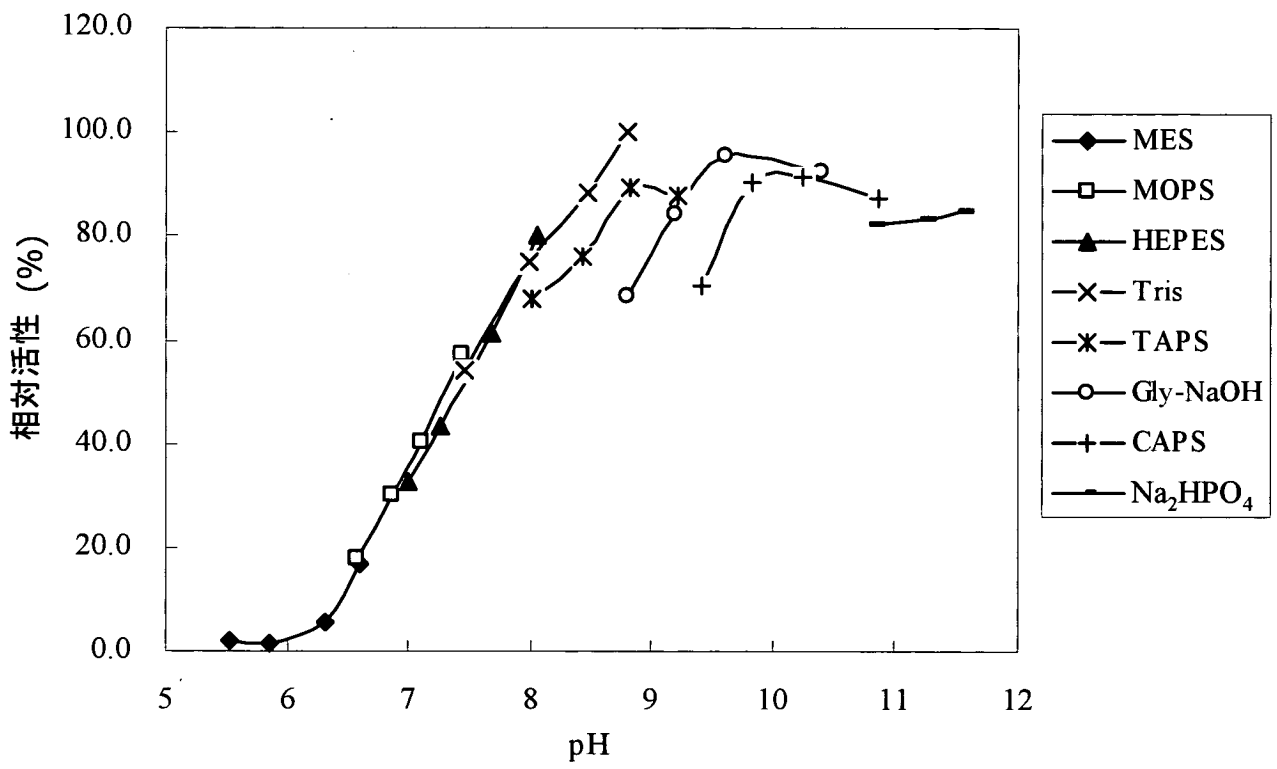
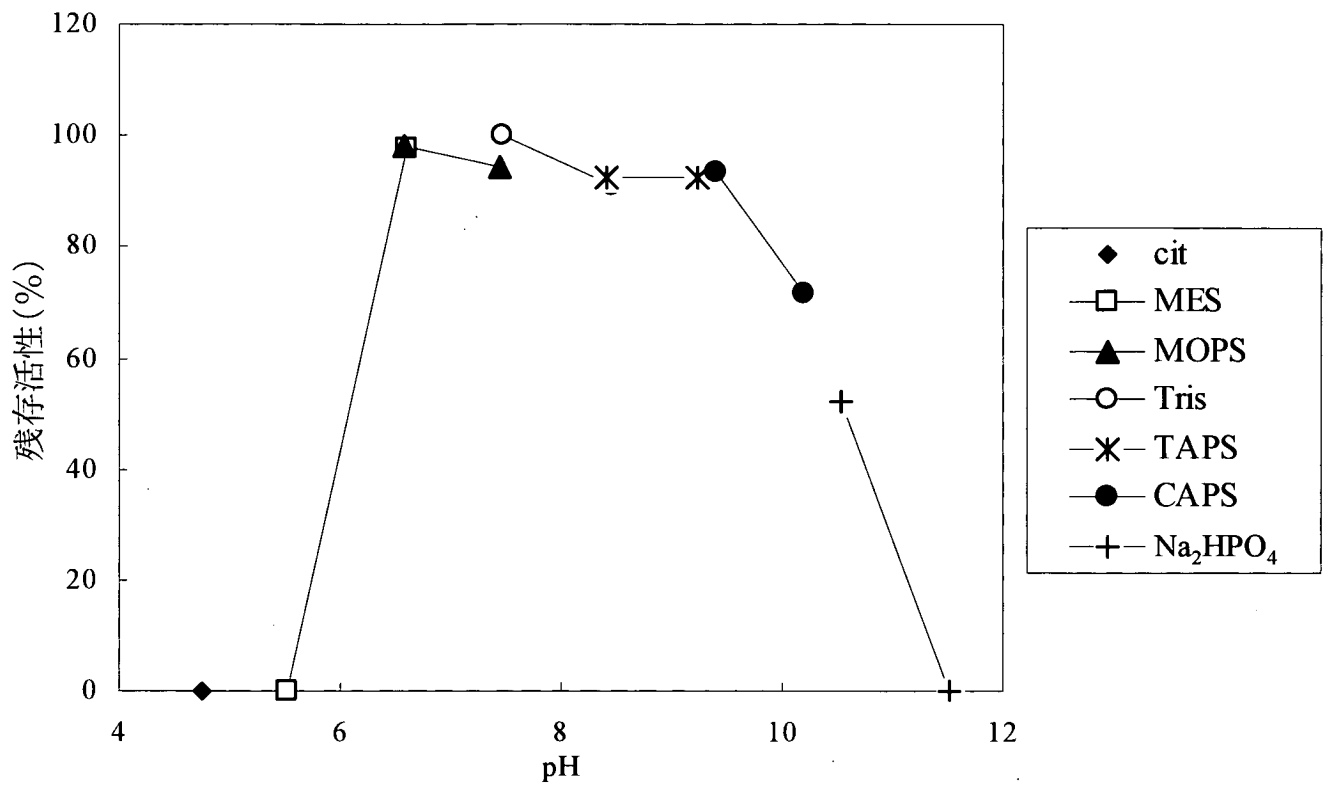
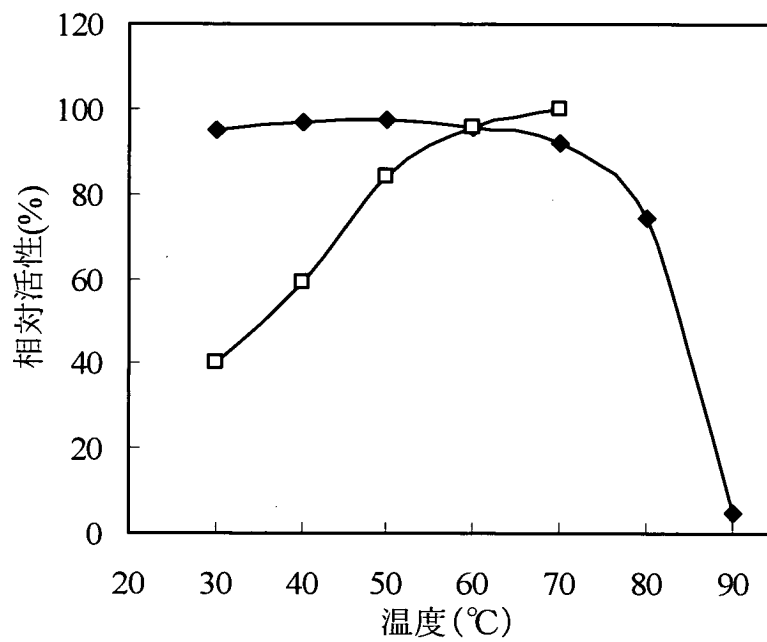


図 3



70°C, 1時間 各pHでインキュベートした後の残存活性

図 4



各温度で1時間インキュベートした後の残存活性 (◆). 各温度での相対比活性 (□)

図 5 A

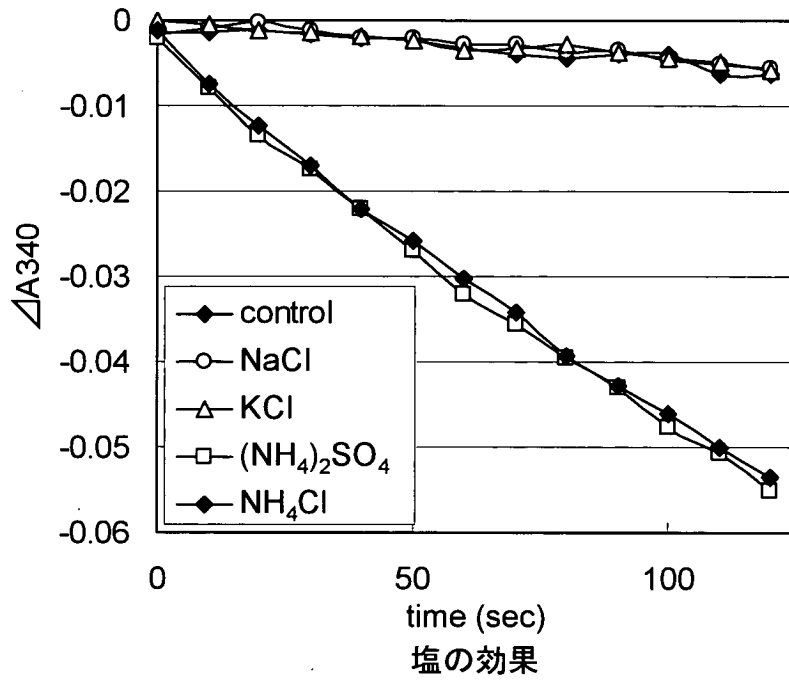


図 5 B

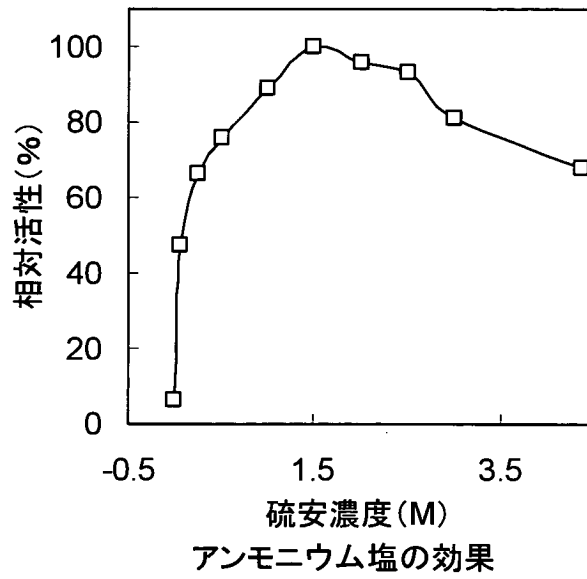


図 6

	Compounds	Relative activity (%)
Metal ion	BaCl ₂	106
	MnCl ₂	101
	MgCl ₂	97
	NiCl ₂	102
	ZnCl ₂	39
	CuCl ₂	42
	HgCl ₂	71
	AgNO ₃	37
	Carbonyl reagent	NaN ₃
Metal chelating reagent	EDTA	110
	8-キノリノール	107
SH reagent	N-エチルマレイミド	110
	ヨードアセテート	105
	ヨードアセトアミド	101
	p-CMBA	187
OH reagent	PMSF	99

種々の化合物1 mM 存在下で3minインキュベートした後の残存活性を測定

図 7

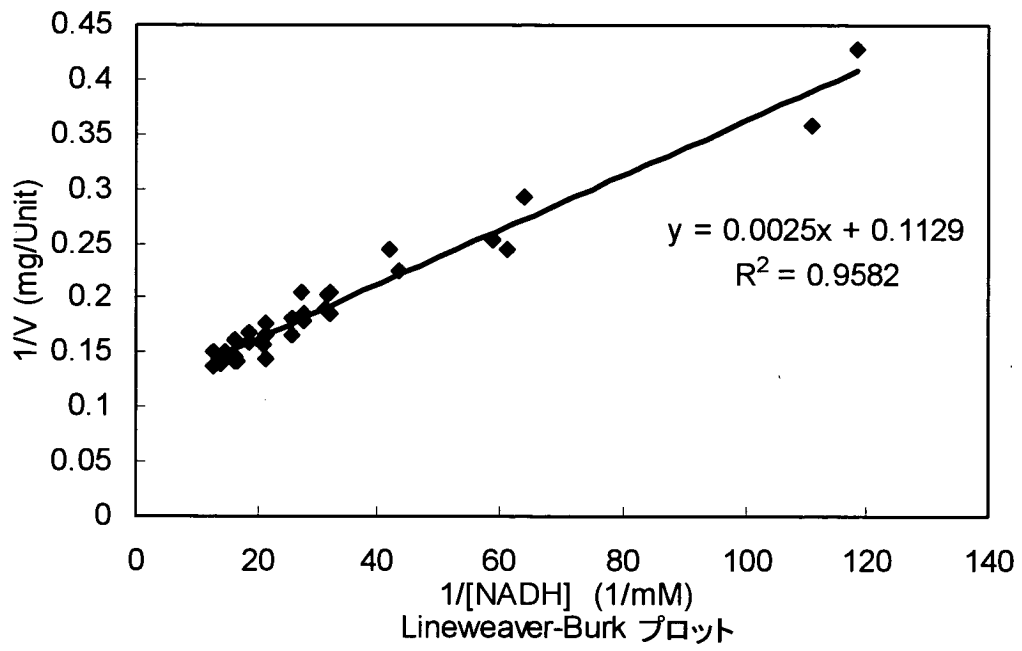


図 8 A

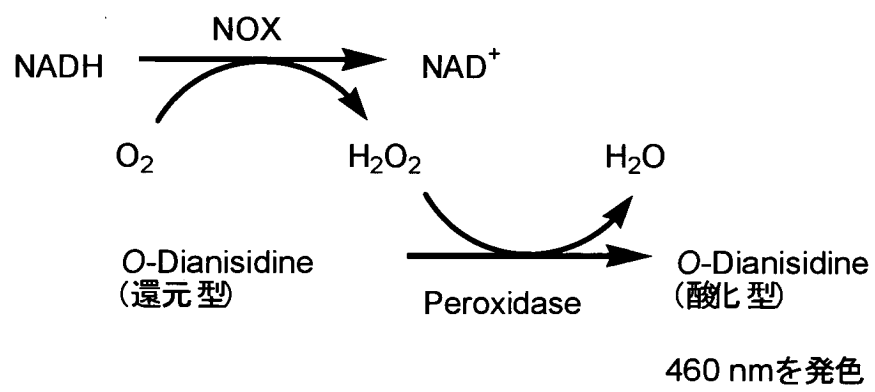


図 8 B

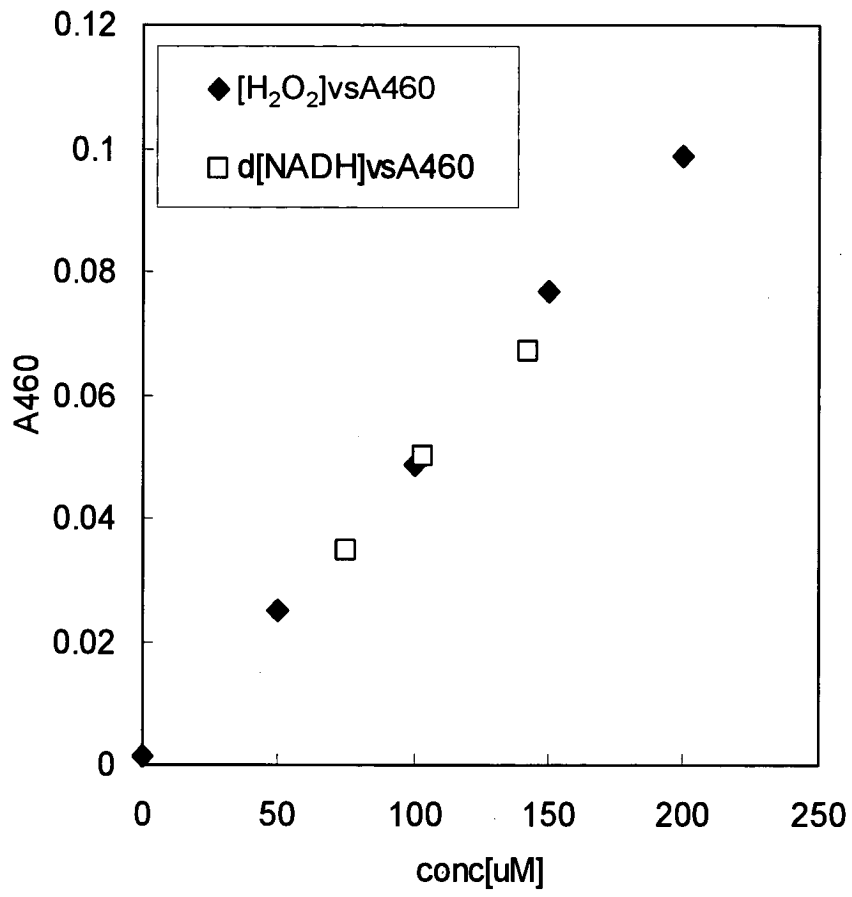
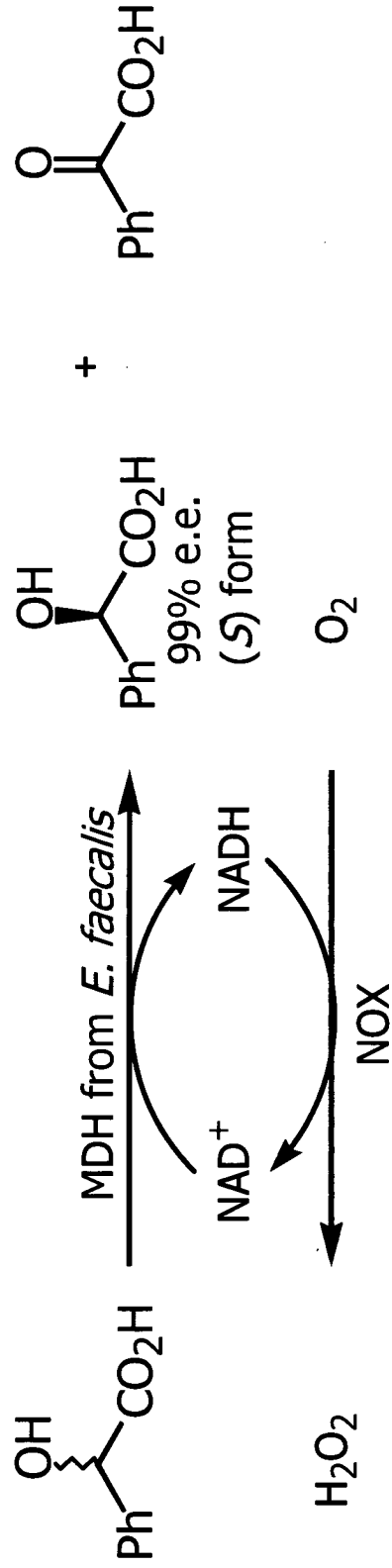


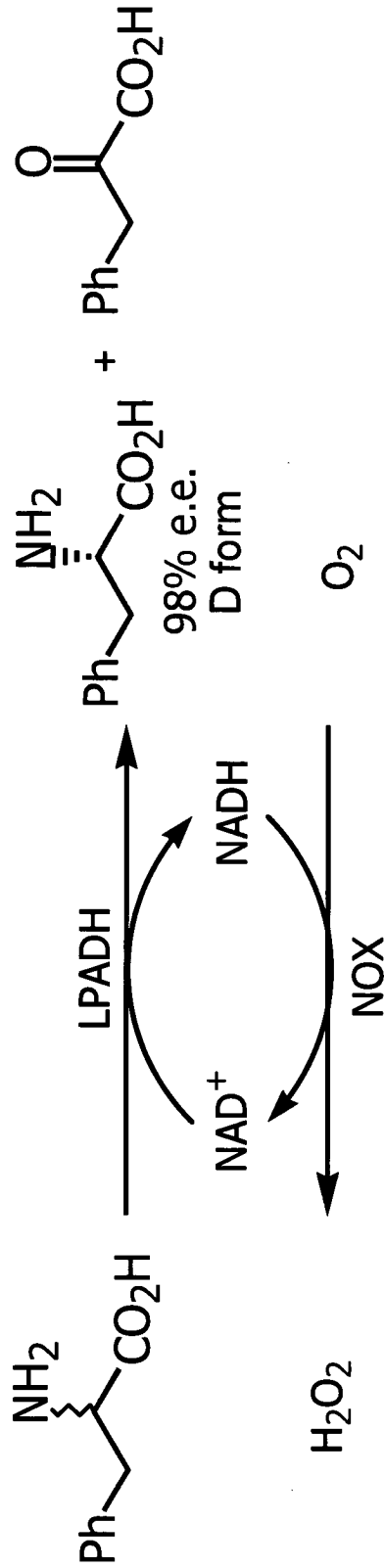
図 9 A



Reaction condition

2 mM mandelate, 0.1 mM NAD^+ , 250 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 100 mM Tris (pH8.8), NOX (0.1U/ml), MDH (0.1 U/ml). 30 °C, 2days

図 9 B



Reaction condition
 2.5 mM DL Phenylalanin, 0.1 mM NAD⁺, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 100 mM CAPS (pH10.2),
 NOX (0.2U/ml), LPADH (0.2U/ml). 30°C, overnight

図 10

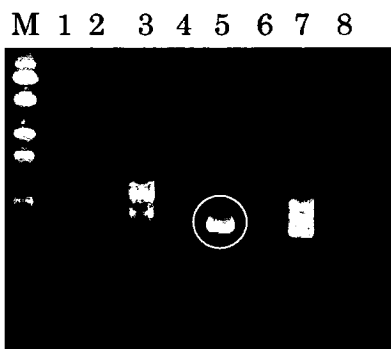


図 1 1

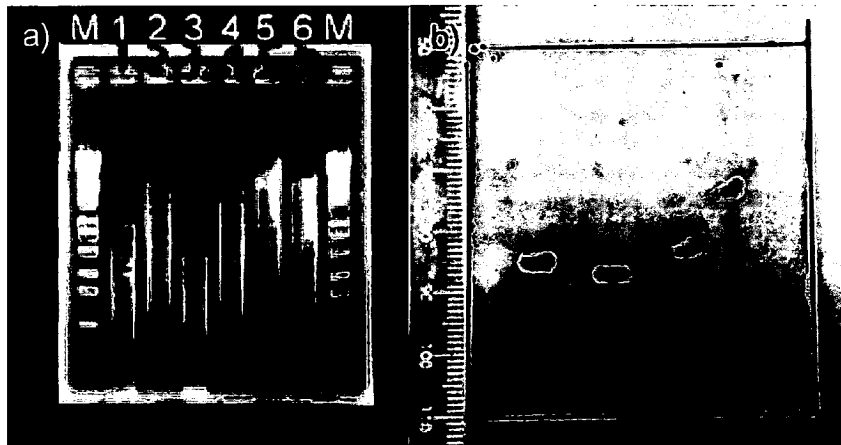


図 1 2

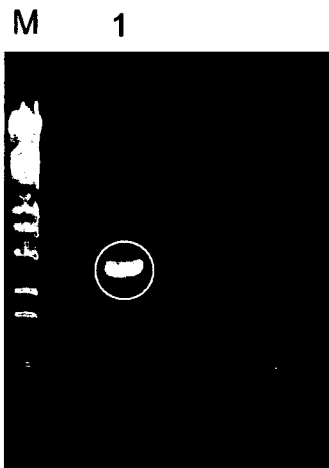


図 1 3 A

```

GTGATGATGCCACCTGTGTCCAATCAGACAGCGTTTTTCTTCGCCCCGCGCAAGAAAAG
TGAAAGATAAGACTGAAAGCTGCGTACTGCAGGCTTATTCACAGCTACGAGGAGAAATCC
1   GTG AGT GAC GAA TTG ACC TAC GAC CTT GTC GTT CTG GGT GGC GGA   45
1   Val Ser Asp Glu Leu Thr Tyr Asp Leu Val Val Leu Gly Gly Gly   15

46  ACC GGT GGC TAT GCC GCT GCT CTG CGA GCC GCA GAG CTC GAC ATG   90
16  Thr Gly Gly Tyr Ala Ala Ala Leu Arg Ala Ala Glu Leu Asp Met   30

91  AAG GTC GCT TTG ATC GAA CGC GAC AAG GTG GGA GGC ACC TGC CTG   135
31  Lys Val Ala Leu Ile Glu Arg Asp Lys Val Gly Gly Thr Cys Leu   45

136 CAC CGT GGC TGC GTT CCG ACG AAG GCT CTT CTG CAC GCC GCA GAA   180
46  His Arg Gly Cys Val Pro Thr Lys Ala Leu Leu His Ala Ala Glu   60

181 GTC GCC GAG ACC GCC AAG AAC TCC GAG ACC TTC GGC ATC GAA GCC   225
61  Val Ala Glu Thr Ala Lys Asn Ser Glu Thr Phe Gly Ile Glu Ala   75

226 GAG TTA CAG GGG ATC GAC ATC GCC AAG GTG CTC GAG TAC AAG GAC   270
76  Glu Leu Gln Gly Ile Asp Ile Ala Lys Val Leu Glu Tyr Lys Asp   90

271 GGG GTC ATC ACC CGC AAC TAC AAG GGT CTG CAG GGT CTG GTC AAG   315
91  Gly Val Ile Thr Arg Asn Tyr Lys Gly Leu Gln Gly Leu Val Lys   105

316 GCT CGC GGA ATC GAC ACC TAC TTC GGC ACC GGC AAG CTC GTC GGC   360
106 Ala Arg Gly Ile Asp Thr Tyr Phe Gly Thr Gly Lys Leu Val Gly   120

361 AAA GAC ACT GTC GAG GTC ACC GGC GAA GAC GGC AAC CAC ACC GTC   405
121 Lys Asp Thr Val Glu Val Thr Gly Glu Asp Gly Asn His Thr Val   135

406 AAG GGC ACG AAC GTT CTG CTC TCG ACC GGT TCG ACA TCG AAG ACC   450
136 Lys Gly Thr Asn Val Leu Leu Ser Thr Gly Ser Thr Ser Lys Thr   150

```

☒ 1 3 B

451	ATC GGA CTC GAG GTC ACC GAC CGC GTG ATC ACG AGC ACC GAG GCT	495
151	Ile Gly Leu Glu Val Thr Asp Arg Val Ile Thr Ser Thr Glu Ala	165
496	CTC CAA CTC GAC AAG GTC CCG AGC TCG GCC ATC GTG CTC GGC GGC	540
166	Leu Gln Leu Asp Lys Val Pro Ser Ser Ala Ile Val Leu Gly Gly	180
541	GGC GTC ATC GGC GTC GAG TTC GCC AGC GTC TGG AAC TCC TTC GGA	585
181	Gly Val Ile Gly Val Glu Phe Ala Ser Val Trp Asn Ser Phe Gly	195
586	GCT GAG GTC ACG ATC GTC GAG GGC CTC AAG CAC CTC GTT GCC AAC	630
196	Ala Glu Val Thr Ile Val Glu Gly Leu Lys His Leu Val Ala Asn	210
631	GAG GAC GAG ACC ATC TCG AAG AAC CTC GAG CGC GCC TTC AAG AAG	675
211	Glu Asp Glu Thr Ile Ser Lys Asn Leu Glu Arg Ala Phe Lys Lys	225
676	CGC AAG ATC AAG TTC AAG CTC GGC GTC ATG TTC AAG GGC GTC GAA	720
226	Arg Lys Ile Lys Phe Lys Leu Gly Val Met Phe Lys <u>Gly</u> Val Glu	240
721	GAG ACG GCC GAC GGG GTC AAG GTC ACT CTC GAA GAC GGT TCG ACG	765
241	Glu Thr Ala Asp Gly Val Lys Val Thr Leu Glu Asp Gly Ser Thr	255
766	CTC GAG GCG GAG TAC CTC CTC GTG GCG GTC GGC CGC GGC CCG GTC	810
256	Leu Glu Ala Glu Tyr Leu Leu Val Ala Val Gly Arg Gly Pro Val	270
811	ACC GAG GGC TTC GGC TTC GAA GAG CAG GGT ATC CCG ATG GAT CGC	855
271	Thr Glu Gly Phe Gly Phe Glu Glu Gln Gly Ile Pro Met Asp Arg	285
856	GGA TTC GTC CTC GCC AGC GAA CGT CTC CAC ACC GGC GTC GGC AAC	900
286	Gly Phe Val Leu Ala Ser Glu Arg Leu His Thr Gly Val Gly Asn	300
901	ATC TAC GCC TGC GGC GAT ATC GTC CCC GGA CTC CAA CTG GCC CAC	945
301	Ile Tyr Ala Cys Gly Asp Ile Val Pro Gly Leu Gln Leu Ala His	315

図 1 3 C

946 CGC GCC TTC GGC CAG GGC ATC TTC ATC GCC GAG GAG ATC GCT GGA 990
 316 Arg Ala Phe Gly Gln Gly Ile Phe Ile Ala Glu Glu Ile Ala Gly 330

 991 CTC AAC CCG GCA CCG GTC GTC GAA TCC GGC ATC CCC CGC GTA ACC 1035
 331 Leu Asn Pro Ala Pro Val Val Glu Ser Gly Ile Pro Arg Val Thr 345

 1036 TAC TGC GAA CCG GAG ATC TTC TCC GTC GGA CTC TCC TCT GCA CAG 1080
 346 Tyr Cys Glu Pro Glu Ile Phe Ser Val Gly Leu Ser Ser Ala Gln 360

 1081 GCG GAA GAG AAG TAC GGC AAG GAT CAG GTC GAA TCG CTC GAG TAC 1125
 361 Ala Glu Glu Lys Tyr Gly Lys Asp Gln Val Glu Ser Leu Glu Tyr 375

 1126 AAC CTC GGC GGC AAC GGC AAG TCC GTG ATC CTG AAC ACG ACA GGT 1170
 376 Asn Leu Gly Gly Asn Gly Lys Ser Val Ile Leu Asn Thr Thr Gly 390

 1171 CTG ATC AAG GTC ATC CGC GAA AAG GAC GGT CCG GTC GTG GGC GTG 1215
 391 Leu Ile Lys Val Ile Arg Glu Lys Asp Gly Pro Val Val Gly Val 405

 1216 CAC GGA ATC GGT GCT CGT CTG TCC GAG CAG GCC GGT GAA GCT CAG 1260
 406 His Gly Ile Gly Ala Arg Leu Ser Glu Gln Ala Gly Glu Ala Gln 420

 1261 CTC ATC GTC AAT TGG GAA GCA TTC CCC GAG GAA GTC GCG CAG CTC 1305
 421 Leu Ile Val Asn Trp Glu Ala Phe Pro Glu Glu Val Ala Gln Leu 435

 1306 ATC CAC GCG CAC CCC ACG CAG AAC GAA GCA CTC GGC GAG GCC CAC 1350
 436 Ile His Ala **His** Pro Thr Gln Asn **Glu** Ala Leu Gly Glu Ala His 450

 1351 CTG GCC CTG GCC GGC AAA CCC CTG CAC TTC CAC TCA TAA 1389
 451 Leu Ala Leu Ala Gly Lys Pro Leu His Phe His Ser End
 GATCCGAGGAGACGAATACTCATGTTTAAATTCGGTTCAGATGCCGGCTCTCGGAGAGTCGGTCACCG
 AGGGCACTGTCACCTCGCTGGCTCAAGGAAAGTGGGCGAAGAA

図 14

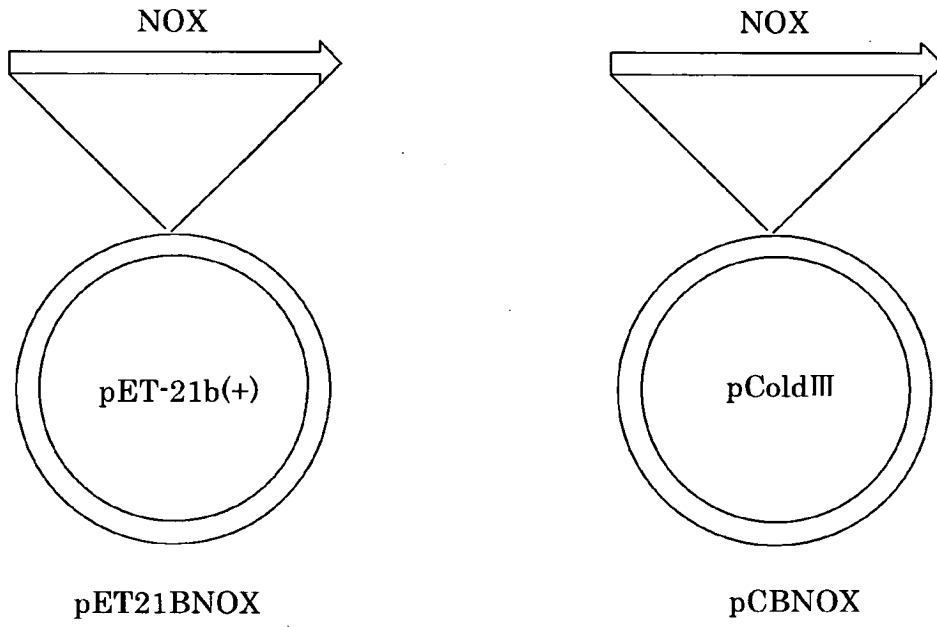
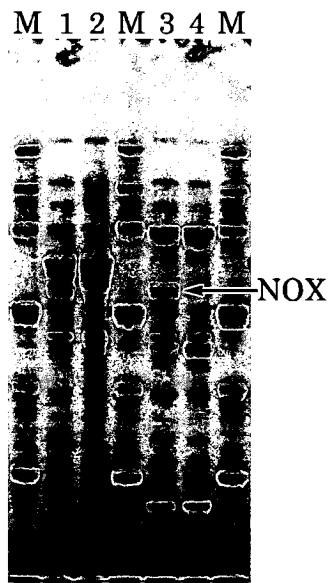


図 15



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/050601

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N9/02(2006.01)i, C12P41/00(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, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/02, C12P41/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2009	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2009

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,
SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 63-44882 A (Takara Shuzo Co., Ltd.), 25 February, 1988 (25.02.88), Full text & US 4954445 A & DE 3725851 A & DE 3725851 A1	1-13
Y	MIYAMOTO, K. et al., Efficient oxidation of alcohols by a 2-phenylethanol-degrading Brevibacterium sp., Biotechnol.Lett., 2004.09, Vol.26, No.17, p.1385-1388	1-13
P,X	JP 2008-92832 A (Keio University), 24 April, 2008 (24.04.08), Full text (Family: none)	1-13

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
08 April, 2009 (08.04.09)

Date of mailing of the international search report
21 April, 2009 (21.04.09)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/050601

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	HIRANO, J. et al., Purification and characterization of thermostable H ₂ O ₂ -forming NADH oxidase from 2-phenylethanol-assimilating <i>Brevibacterium</i> sp. KU1309, <i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> , 2008.08, Vol.80, No.1, p.71-78	1-13

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N9/02(2006.01)i, C12P41/00(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, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/02, C12P41/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2009年
日本国実用新案登録公報	1996-2009年
日本国登録実用新案公報	1994-2009年

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

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

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
Y	JP 63-44882 A (宝酒造株式会社) 1988.02.25, 全文 & US 4954445 A & DE 3725851 A & DE 3725851 A1	1-13
Y	MIYAMOTO, K. et al., Efficient oxidation of alcohols by a 2-phenylethanol-degrading Brevibacterium sp., Biotechnol.Lett., 2004.09, Vol.26, No.17, p.1385-1388	1-13

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.04.2009

国際調査報告の発送日

21.04.2009

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)

高堀 栄二

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

4N

9281

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	JP 2008-92832 A (学校法人慶應義塾) 2008.04.24, 全文 (ファミリーなし)	1-13
P, X	HIRANO, J. et al., Purification and characterization of thermostable H ₂ O ₂ -forming NADH oxidase from 2-phenylethanol-assimilating Brevibacterium sp. KU1309, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2008.08, Vol. 80, No. 1, p. 71-78	1-13

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. c の続き)

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

- a. タイプ 配列表
 配列表に関連するテーブル
- b. フォーマット 紙形式
 電子形式
- c. 提出時期 出願時の国際出願に含まれていたもの
 この国際出願と共に電子形式により提出されたもの
 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出されたもの

2. さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：