

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02016/136620

発行日 平成29年9月7日 (2017.9.7)

(43) 国際公開日 **平成28年9月1日 (2016.9.1)**

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 1 2 P 19/32 (2006.01)	C 1 2 P 19/32	4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B 0 6 5

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 25 頁)

出願番号	特願2017-502323 (P2017-502323)	(71) 出願人	503360115 国立研究開発法人科学技術振興機構 埼玉県川口市本町四丁目1番8号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2016/054872	(74) 代理人	100064908 弁理士 志賀 正武
(22) 国際出願日	平成28年2月19日 (2016.2.19)	(74) 代理人	100094400 弁理士 鈴木 三義
(31) 優先権主張番号	特願2015-33843 (P2015-33843)	(74) 代理人	100147267 弁理士 大概 真紀子
(32) 優先日	平成27年2月24日 (2015.2.24)	(72) 発明者	本田 孝祐 大阪府吹田市山田丘2-1 国立大学法人 大阪大学大学院工学研究科内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	跡見 晴幸 京都府京都市西京区京都大学桂 国立大学 法人京都大学工学研究科内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 補酵素の製造方法及び補酵素製造用形質転換体セット

(57) 【要約】

本発明は、 NAD^+ 又は NADH を必要とする酵素反応系に対して、熱分解により失われる NAD^+ を補充するために、当該酵素反応系内において NAD^+ 又は NADH を合成する方法、及び当該方法に用いる補酵素製造用形質転換体セットを提供する。すなわち、本発明は、 NAD^+ 又は NADH を必要とする酵素反応系に、ニコチンアミドから NAD^+ を合成するための反応に要する1種又は2種以上の耐熱性酵素を添加することにより、前記酵素反応系内において NAD^+ 又は NADH の合成を行うことを特徴とする、補酵素の製造方法、及び非耐熱性微生物を宿主とし、ニコチンアミドから NAD^+ 又は NADH を合成するための反応に要する1種又は2種以上の耐熱性酵素をコードしている遺伝子が導入された1種又は2種以上の形質転換体からなることを特徴とする、補酵素製造用形質転換体セットである。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

NAD⁺を必要とする酵素反応系に、ADP-リボースとニコチンアミドからNAD⁺を合成するための反応に要する1種又は2種以上の耐熱性酵素を添加することにより、前記酵素反応系内においてNAD⁺の合成を行うことを特徴とする、補酵素の製造方法。

【請求項 2】

前記NAD⁺を合成するための反応に要する耐熱性酵素が、ニコチンアミダーゼ、ニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ、ニコチン酸-ヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ、NAD⁺シンターゼ、ADP-リボースピロホスファターゼ、及びリボースリン酸ピロホスホキナーゼである、請求項1に記載の補酵素の製造方法。

10

【請求項 3】

NADHを必要とする酵素反応系に、ADP-リボースとニコチンアミドからNADHを合成するための反応に要する1種又は2種以上の耐熱性酵素を添加することにより、前記酵素反応系内においてNADHの合成を行うことを特徴とする、補酵素の製造方法。

【請求項 4】

前記NADHを合成するための反応に要する耐熱性酵素が、ニコチンアミダーゼ、ニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ、ニコチン酸-ヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ、NAD⁺シンターゼ、ADP-リボースピロホスファターゼ、リボースリン酸ピロホスホキナーゼ、及びNAD⁺からNADHを合成する反応を触媒する酸化還元酵素である、請求項3に記載の補酵素の製造方法。

20

【請求項 5】

前記酸化還元酵素が、糖、アルコール、又は有機酸を基質とするデヒドロゲナーゼである、請求項4に記載の補酵素の製造方法。

【請求項 6】

前記酵素反応系内に、さらに、AMP又はADPからATPを合成するための反応に要する1種又は2種以上の耐熱性酵素を添加し、前記酵素反応系内においてATPの合成を行う、請求項1～5のいずれか一項に記載の補酵素の製造方法。

【請求項 7】

前記ATPを合成するための反応に要する耐熱性酵素が、アデニル酸キナーゼ及びポリリン酸キナーゼである、請求項6に記載の補酵素の製造方法。

30

【請求項 8】

前記耐熱性酵素が、非耐熱性微生物の発現系によって合成されたものである、請求項1～7のいずれか一項に記載の補酵素の製造方法。

【請求項 9】

前記耐熱性酵素が、非耐熱性微生物を宿主とし、耐熱性酵素をコードしている遺伝子を導入した形質転換体が合成したものである、請求項1～7のいずれか一項に記載の補酵素の製造方法。

【請求項 10】

前記形質転換体を培養して得られた菌体の加熱処理物を、前記酵素反応系に添加する、請求項9に記載の補酵素の製造方法。

40

【請求項 11】

前記非耐熱性微生物が大腸菌である、請求項8～10のいずれか一項に記載の補酵素の製造方法。

【請求項 12】

非耐熱性微生物を宿主とし、ADP-リボースとニコチンアミドからNAD⁺又はNADHを合成するための反応に要する1種又は2種以上の耐熱性酵素をコードしている遺伝子が導入された1種又は2種以上の形質転換体からなることを特徴とする、補酵素製造用形質転換体セット。

【請求項 13】

前記耐熱性酵素が、ニコチンアミダーゼ、ニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラー

50

ゼ、ニコチン酸 - ヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ、 NAD^+ シンターゼ、 ADP - リボースピロホスファターゼ、及びリボースリン酸ピロホスホキナーゼである、請求項 1 2 に記載の補酵素製造用形質転換体セット。

【請求項 1 4】

前記耐熱性酵素が、ニコチンアミダーゼ、ニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ、ニコチン酸 - ヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ、 NAD^+ シンターゼ、 ADP - リボースピロホスファターゼ、リボースリン酸ピロホスホキナーゼ、及び NAD^+ から NADH を合成する反応を触媒する酸化還元酵素である、請求項 1 2 に記載の補酵素製造用形質転換体セット。

【請求項 1 5】

さらに、非耐熱性微生物を宿主とし、 AMP 又は ADP から ATP を合成するための反応に要する 1 種又は 2 種以上の耐熱性酵素をコードしている遺伝子が導入された 1 種又は 2 種以上の形質転換体を含む、請求項 1 2 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の補酵素製造用形質転換体セット。

【請求項 1 6】

1 の形質転換体に 1 種類の耐熱性酵素をコードする遺伝子が導入されている、請求項 1 2 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の補酵素製造用形質転換体セット。

【請求項 1 7】

前記非耐熱性微生物が大腸菌である、請求項 1 2 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の補酵素製造用形質転換体セット。

【請求項 1 8】

前記形質転換体が、加熱処理されたものである、請求項 1 2 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の補酵素製造用形質転換体セット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、 NAD^+ 又は NADH を必要とする酵素反応系において、 NAD^+ の分解産物から NAD^+ 又は NADH を合成する方法、及び当該方法に用いる NAD^+ 又は NADH を製造するための形質転換体セットに関する。

本願は、2015年2月24日に、日本に出願された特願2015-33843号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

【背景技術】

【0002】

近年の遺伝子改変技術の発達に伴い、微生物を合成反応の反応系として用い、有用な有機化合物を微生物が備える代謝経路を利用して製造する方法が、工業上の量産にも利用されつつある。さらに、より効率よく有機化合物を合成するために、生きた微生物の代謝経路を改変するのではなく、複数の代謝酵素を予めモジュール化し、これらを任意に組み合わせることによって物質生産に特化した合成経路を人工的に構築すること（人工代謝システム）も試みられている。人工代謝システムを利用した方法により、例えば、グルコースやグリセロールから乳酸、リンゴ酸、1-ブタノールなどが選択的かつ高収率に生産できたことが報告されている（例えば、非特許文献1参照。）。 40

【0003】

モジュール化して使用される代謝酵素（酵素モジュール）は、微生物に当該代謝酵素をコードする遺伝子を導入した形質転換体に産生させることにより、安価かつ簡便に提供可能である。中でも、酵素モジュールとしては、物理的及び化学的な安定性に優れており、工業的利用に適していることから、耐熱性酵素を使用することが好ましい。耐熱性酵素を微生物によって産生する方法としては、例えば、非耐熱性の抗酸菌に目的の耐熱性酵素をコードする遺伝子を導入した形質転換体を培養して当該形質転換体内に耐熱性酵素を産生させた後、培養された菌体物を加熱処理することによって、形質転換体の死滅菌体内に固定化された耐熱性酵素を得る方法が開示されている（例えば、特許文献1参照。）。当該 50

10

20

30

40

50

方法では、宿主である抗酸菌に由来するタンパク質が全て失活されており、目的の耐熱性酵素のみが活性を保持した状態で形質転換体の死滅菌体内に固定化されているため、当該死滅菌体をそのまま反応系に添加した場合でも、宿主由来の酵素による副反応が生じないという利点がある。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特開2011-160778号公報

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Krutsakorn, et al., Metabolic Engineering, 2013, vol.20, p.84~91.

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

人工代謝システムを利用した方法によれば、基質特異性や合成物の立体選択性に優れ、かつ比較的穏和な条件下で目的の有機化合物を合成することができるという酵素反応の利点を活かし、有機合成では製造が困難であった有機化合物をより効率的に製造することができる。しかし、当該方法は、長時間反応時の安定性に乏しく、結果として得られる目的の有機化合物量は、工業上の量産レベルには未だ達していない。これは、用いる酵素モジュールの安定性の問題ではなく、酵素反応に必要な補酵素、特に酸化還元補酵素であるNAD⁺、NADHの熱分解に起因するためである。長時間安定して目的の有機化合物を合成するためには、熱分解により減少したNAD⁺やNADHを反応系外から適宜補充する必要があるが、NAD⁺等は比較的高価であり、このことが、人工代謝システムを利用した方法の工業上利用が進まない一因となっている。

20

【0007】

本発明は、NAD⁺又はNADHを必要とする酵素反応系に対して、熱分解により失われるNAD⁺又はNADHを補充するために、当該酵素反応系内においてNAD⁺又はNADHを合成する方法、及び当該方法に用いるNAD⁺又はNADHを製造するための形質転換体セットを提供することを主たる目的とする。

30

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、鋭意研究した結果、NAD⁺の熱分解産物であるニコチンアミドからNAD⁺をサルベージ合成するための人工代謝経路(NAD⁺人工合成経路)及びニコチンアミドからNADHをサルベージ合成するための人工代謝経路(NADH人工合成経路)を構築し、NAD⁺又はNADHを必要とする酵素反応系に対して、直接NAD⁺又はNADHを外添するのではなく、NAD⁺人工合成経路又はNADH人工合成経路に必要な代謝酵素を添加し、当該酵素反応系内においてNAD⁺又はNADHを合成することによって、熱分解により失われるNAD⁺又はNADHをより安価に補充できることを見出し、本発明を完成させた。

40

【0009】

すなわち、本発明に係る補酵素の製造方法及び補酵素製造用形質転換体セットは、下記[1]~[18]である。

[1] NAD⁺を必要とする酵素反応系に、ADP-リボースとニコチンアミドからNAD⁺を合成するための反応に要する1種又は2種以上の耐熱性酵素を添加することにより、前記酵素反応系内においてNAD⁺の合成を行うことを特徴とする、補酵素の製造方法。

[2] 前記NAD⁺を合成するための反応に要する耐熱性酵素が、ニコチンアミダーゼ、ニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ、ニコチン酸-ヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ、NAD⁺シンターゼ、ADP-リボースピロホスファターゼ、及び

50

リボースリン酸ピロホスホキナーゼである、前記 [1] の補酵素の製造方法。

[3] NADHを必要とする酵素反応系に、ADP - リボースとニコチンアミドからNADHを合成するための反応に要する1種又は2種以上の耐熱性酵素を添加することにより、前記酵素反応系内においてNADHの合成を行うことを特徴とする、補酵素の製造方法。

[4] 前記NADHを合成するための反応に要する耐熱性酵素が、ニコチンアミダーゼ、ニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ、ニコチン酸 - ヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ、NAD⁺シンターゼ、ADP - リボースピロホスファターゼ、リボースリン酸ピロホスホキナーゼ、及びNAD⁺からNADHを合成する反応を触媒する酸化還元酵素である、前記 [3] の補酵素の製造方法。

10

[5] 前記酸化還元酵素が、糖、アルコール、又は有機酸を基質とするデヒドロゲナーゼである、前記 [4] の補酵素の製造方法。

[6] 前記酵素反応系内に、さらに、AMP又はADPからATPを合成するための反応に要する1種又は2種以上の耐熱性酵素を添加し、前記酵素反応系内においてATPの合成を行う、前記 [1] ~ [5] のいずれかの補酵素の製造方法。

[7] 前記ATPを合成するための反応に要する耐熱性酵素が、アデニル酸キナーゼ及びポリリン酸キナーゼである、前記 [6] の補酵素の製造方法。

[8] 前記耐熱性酵素が、非耐熱性微生物の発現系によって合成されたものである、前記 [1] ~ [7] のいずれかの補酵素の製造方法。

20

[9] 前記耐熱性酵素が、非耐熱性微生物を宿主とし、耐熱性酵素をコードしている遺伝子を導入した形質転換体が合成したものである、前記 [1] ~ [8] のいずれかの補酵素の製造方法。

[10] 前記形質転換体を培養して得られた菌体の加熱処理物を、前記酵素反応系に添加する、前記 [9] の補酵素の製造方法。

[11] 前記非耐熱性微生物が大腸菌である、前記 [8] ~ [10] のいずれかの補酵素の製造方法。

[12] 非耐熱性微生物を宿主とし、ADP - リボースとニコチンアミドからNAD⁺又はNADHを合成するための反応に要する1種又は2種以上の耐熱性酵素をコードしている遺伝子が導入された1種又は2種以上の形質転換体からなることを特徴とする、補酵素製造用形質転換体セット。

30

[13] 前記耐熱性酵素が、ニコチンアミダーゼ、ニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ、ニコチン酸 - ヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ、NAD⁺シンターゼ、ADP - リボースピロホスファターゼ、及びリボースリン酸ピロホスホキナーゼである、前記 [12] の補酵素製造用形質転換体セット。

[14] 前記耐熱性酵素が、ニコチンアミダーゼ、ニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ、ニコチン酸 - ヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ、NAD⁺シンターゼ、ADP - リボースピロホスファターゼ、リボースリン酸ピロホスホキナーゼ、及びNAD⁺からNADHを合成する反応を触媒する酸化還元酵素である、前記 [12] の補酵素製造用形質転換体セット。

[15] さらに、非耐熱性微生物を宿主とし、AMP又はADPからATPを合成するための反応に要する1種又は2種以上の耐熱性酵素をコードしている遺伝子が導入された1種又は2種以上の形質転換体を含む、前記 [12] ~ [14] のいずれかの補酵素製造用形質転換体セット。

40

[16] 1の形質転換体に1種類の耐熱性酵素をコードする遺伝子が導入されている、前記 [12] ~ [15] のいずれかの補酵素製造用形質転換体セット。

[17] 前記非耐熱性微生物が大腸菌である、前記 [12] ~ [16] のいずれかの補酵素製造用形質転換体セット。

[18] 前記形質転換体が、加熱処理されたものである、前記 [12] ~ [17] のいずれかの補酵素製造用形質転換体セット。

【発明の効果】

50

【0010】

本発明に係る補酵素の製造方法により、熱分解により失われやすい NAD^+ 又は NADH を補酵素として必須とする酵素を用いた酵素反応系において、酵素反応開始後に高価な NAD^+ 又は NADH を外添せずとも、長時間安定して目的の酵素反応を行うことができる。

また、本発明に係る補酵素製造用形質転換体セットにより、より簡便に、前記補酵素の製造方法を実施することができる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】 ADP -リボースとニコチンアミドを出発原料とした NAD^+ サルベージ合成経路の一態様を示した図である。

10

【図2】ニコチンアミドを出発原料とした NAD^+ サルベージ合成経路の一態様を示した図である。

【図3】 ATP 合成経路の一態様を示した図である。

【図4】参考例1において、 NAD^+ の熱分解反応を示した図である。

【図5】参考例1において、 NAD^+ の熱分解反応における NAD^+ 、ニコチンアミド、及び ADP -リボースの経時的変化を示した図である。

【図6】実施例1において、横軸に示す濃度の NAD^+ の存在下における TtNAPRT 活性値(NAD^+ を含まない反応液中での活性を100%とした場合の相対活性値)

【図7】実施例1において、 NAD^+ サルベージ合成経路及び ATP 合成経路に要する耐熱性酵素群と NAD^+ を含有する反応液を60 でインキュベートした場合の反応液中の NAD^+ 濃度の経時的変化を示した図である。

20

【図8】実施例2において、 NAD^+ サルベージ合成経路及び ATP 合成経路に要する耐熱性酵素群と NAD^+ とを含有する反応液を60 でインキュベートした場合の反応液中の NAD^+ 濃度の経時的変化を示した図である。

【図9】実施例3において、 NADH サルベージ合成経路及び ATP 合成経路に要する耐熱性酵素群と NADH とを含有する反応液を60 でインキュベートした場合の反応液中の NADH 濃度の経時的変化を示した図である。

【発明を実施するための形態】

【0012】

30

本発明に係る補酵素の製造方法は、 NAD^+ 又は NADH を必要とする酵素反応系に、ニコチンアミドから NAD^+ 又は NADH を合成するための反応に要する1種又は2種以上の耐熱性酵素を添加することにより、前記酵素反応系内において NAD^+ 又は NADH のサルベージ合成を行うことを特徴とする。本発明に係る補酵素の製造方法は、 NAD^+ と NADH の両方を必要とする酵素反応系に利用してもよい。本発明に係る補酵素の製造方法のうち、 NAD^+ を必要とする酵素反応系に、 NAD^+ を合成するための反応に要する1種又は2種以上の耐熱性酵素を添加して NAD^+ のサルベージ合成を行う方法を、「 NAD^+ の製造方法」という。本発明に係る補酵素の製造方法のうち、 NADH を必要とする酵素反応系に、 NADH を合成するための反応に要する1種又は2種以上の耐熱性酵素を添加して NADH のサルベージ合成を行う方法を、「 NADH の製造方法」という。 NAD^+ 又は NADH を必要とする酵素反応系内において、 NAD^+ 又は NADH の熱分解物であるニコチンアミドから NAD^+ 又は NADH を合成させることにより、 NAD^+ 又は NADH を直接外添せずとも、熱分解により失われた NAD^+ 又は NADH を補充し、当該酵素反応系の目的産物である有機化合物を長時間安定的に合成することができる。

40

【0013】

本発明に係る NAD^+ の製造方法において、「 NAD^+ を必要とする酵素反応系」は、細胞外の反応系(いわゆる*in vitro*の反応系)であって、 NAD^+ を補酵素とする酵素による酵素反応を含む反応系を意味する。当該酵素反応系は、1段階の酵素反応のみからなる反応系であってもよく、2段階以上の酵素反応からなる反応系であってもよい。2段階以上の酵素反応からなる酵素反応系の場合には、少なくとも1の段階が NAD^+ を補酵素

50

とする酵素による酵素反応であればよい。また、 NAD^+ を補酵素とする酵素も、特に限定されるものではなく、目的の有機化合物及び反応経路に基づいて適宜決定することができる。

【0014】

本発明に係る NADH の製造方法において、「 NADH を必要とする酵素反応系」は、細胞外の反応系（いわゆる *in vitro* の反応系）であって、 NADH を補酵素とする酵素による酵素反応を含む反応系を意味する。当該酵素反応系は、1段階の酵素反応のみからなる反応系であってもよく、2段階以上の酵素反応からなる反応系であってもよい。2段階以上の酵素反応からなる酵素反応系の場合には、少なくとも1の段階が NADH を補酵素とする酵素による酵素反応であればよい。また、 NADH を補酵素とする酵素も、特に限定されるものではなく、目的の有機化合物及び反応経路に基づいて適宜決定することができる。

10

【0015】

本発明に係る補酵素の製造方法において、 NAD^+ 又は NADH を必要とする酵素反応系としては、中性～アルカリ性の環境下で行われる反応系が好ましく、 pH が7.6～9.0の弱アルカリ性環境下で行われる反応系がより好ましく、 pH が7.8～8.5の弱アルカリ性環境下で行われる反応系がさらに好ましい。反応系の pH が中性～アルカリ性の場合には、 NAD^+ や NADH の熱分解の主たる産物がニコチンアミドと ADP -リボースになり、本発明に係る補酵素の製造方法により効率よく NAD^+ 及び NADH を再合成できるためである。

20

【0016】

なお、 NAD^+ 又は NADH を必要とする酵素反応系が合成する目的の有機化合物は、特に限定されるものではないが、乳酸、リンゴ酸、*n*-ブタノール等のように、化学合成品や医薬品、化粧品、飲食品等の原材料として有用な有機化合物であることが好ましい。

【0017】

本発明に係る NAD^+ の製造方法において、「ニコチンアミドから NAD^+ を合成するための反応」は、ニコチンアミドを基質とする1段階又は2段階以上の酵素反応により、最終的に NAD^+ を合成する酵素反応を意味する。当該反応は、以降、「 NAD^+ サルベージ合成経路」ということがある。 NAD^+ サルベージ合成経路は、いずれかの生物が本来有する天然の代謝経路であってもよく、当該天然の代謝経路を適宜改変したものであってもよく、人工的に合成した代謝経路であってもよい。

30

【0018】

NAD^+ サルベージ合成経路としては、具体的には、例えば、図1に示すように、 ADP -リボースとニコチンアミドを出発原料とし、ニコチンアミダーゼ (NAAse)、ニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ (NAPRT)、ニコチン酸-ヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ (NMAT)、 NAD^+ シンターゼ (NADS)、 ADP -リボースピロホスファターゼ (ADPRP)、及びリボースリン酸ピロホスホキナーゼ (RPK)を用いた経路が挙げられる。 ADP -リボースを基質として ADP -リボースピロホスファターゼによりリボース-5-リン酸が合成され、リボース-5-リン酸を基質としてリボースリン酸ピロホスホキナーゼによりホスホリボシルピロリン酸 (PRPP) が合成される。これとは独立して、ニコチンアミドを基質とし、ニコチンアミダーゼによりニコチン酸が合成される。ニコチン酸とホスホリボシルピロリン酸を基質としてニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼによりニコチン酸モノヌクレオチド (NaMN) が合成され、ニコチン酸モノヌクレオチドと ATP からニコチン酸-ヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼによりデアミノ NAD^+ が合成される。このデアミノ NAD^+ を基質として NAD^+ シンターゼにより NAD^+ が合成される。

40

【0019】

NAD^+ サルベージ合成経路としては、また、例えば、図2に示すように、ニコチンアミドを出発原料とし、 NMN ヌクレオシダーゼ及びニコチン酸-ヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼを用いた経路が挙げられる。ニコチンアミドとホスホリボシルピロリ

50

ン酸 (P R P P) 等のリン酸化リボース供与体から N M N ヌクレオシダーゼによりニコチンアミドモノヌクレオチド (N M N) が合成され、ニコチンアミドモノヌクレオチドを基質としてニコチン酸 - ヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼにより N A D ⁺ が合成される。

【 0 0 2 0 】

本発明に係る N A D H の製造方法において、「ニコチンアミドから N A D H を合成するための反応」は、ニコチンアミドを基質とする 1 段階又は 2 段階以上の酵素反応により、最終的に N A D H を合成する酵素反応を意味する。当該反応は、以降、「 N A D H サルベージ合成経路」ということがある。 N A D H サルベージ合成経路は、いずれかの生物が本来有する天然の代謝経路であってもよく、当該天然の代謝経路を適宜改変したものであってもよく、人工的に合成した代謝経路であってもよい。

10

【 0 0 2 1 】

N A D H は、熱分解によりまず N A D ⁺ に分解され、その後、 A D P - リボースとニコチンアミドにまで分解される。そこで、 N A D H サルベージ合成経路としては、 A D P - リボースとニコチンアミドから N A D H を合成する反応経路が好ましい。例えば、前記 N A D ⁺ サルベージ合成経路に、 N A D ⁺ から N A D H を合成する反応を触媒する酸化還元酵素を付加した経路を、 N A D H サルベージ合成経路とすることができる。

【 0 0 2 2 】

N A D ⁺ から N A D H を合成する反応は、 N A D ⁺ を補酵素とする各種の酸化反応によって行うことができる。 N A D ⁺ を補酵素とする酸化反応の基質や酸化還元酵素としては、特に限定されるものではない。本発明において用いられる N A D ⁺ から N A D H を合成する反応を触媒する酸化還元酵素としては、例えば、糖、アルコール、又は有機酸を基質とするデヒドロゲナーゼを用いることができる。糖を基質とするデヒドロゲナーゼとしては、グルコースデヒドロゲナーゼ (E C . 1 . 1 . 1 . 4 7) 、 グルコース - 6 - リン酸デヒドロゲナーゼ (E C . 1 . 1 . 1 . 4 9) 、 ガラクトース - 1 - デヒドロゲナーゼ (E C . 1 . 1 . 1 . 4 8) 、 L - アラビノース - 1 - デヒドロゲナーゼ (E C . 1 . 1 . 1 . 4 6) 、 D - キシロース - 1 - デヒドロゲナーゼ (E C . 1 . 1 . 1 . 1 7 5) 、 グルクロン酸レダクターゼ (E C . 1 . 1 . 1 . 1 9) 等が挙げられる。アルコールを基質とするデヒドロゲナーゼとしては、アルコールデヒドロゲナーゼ (E C . 1 . 1 . 1 . 1) 、 グリセロールデヒドロゲナーゼ (E C . 1 . 1 . 1 . 6) 、 グリセロール - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ (N A D ⁺) (E C . 1 . 1 . 1 . 8) 、 マンニトール - 1 - リン酸 - 5 - デヒドロゲナーゼ (E C . 1 . 1 . 1 . 1 7) 、 イノシトール - 2 - デヒドロゲナーゼ (E C . 1 . 1 . 1 . 1 8) 、 マンニトール - 2 - デヒドロゲナーゼ (E C . 1 . 1 . 1 . 6 7) 等が挙げられる。有機酸を基質とするデヒドロゲナーゼとしては、乳酸デヒドロゲナーゼ (E C . 1 . 1 . 1 . 2 7 、 E C . 1 . 1 . 1 . 2 8) 、 リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (E C . 1 . 1 . 1 . 3 7 、 E C . 1 . 1 . 1 . 3 8 、 E C . 1 . 1 . 1 . 3 9) 、 イソクエン酸デヒドロゲナーゼ (E C . 1 . 1 . 1 . 4 1) 、 酒石酸デヒドロゲナーゼ (E C . 1 . 1 . 1 . 9 3) 、 グルコン酸 - 5 - デヒドロゲナーゼ (E C . 1 . 1 . 1 . 6 9) ギ酸デヒドロゲナーゼ (E C . E C . 1 . 2 . 1 . 2) 等が挙げられる。

20

30

【 0 0 2 3 】

本発明において用いられる N A D ⁺ から N A D H を合成する反応を触媒する酸化還元酵素としては、基質が比較的安価であることから、グルコースデヒドロゲナーゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、又は乳酸デヒドロゲナーゼを用いることが特に好ましい。例えば、 N A D H のサルベージ合成を行う酵素反応系に、グルコースとグルコースデヒドロゲナーゼを添加することにより、サルベージ合成された N A D ⁺ とグルコースからグルコースデヒドロゲナーゼにより、グルコノラクトンと共に N A D H が合成される。同様に、 N A D H のサルベージ合成を行う酵素反応系に、ギ酸とギ酸デヒドロゲナーゼを添加することによって二酸化炭素と共に N A D H が合成され、アルコールとアルコールデヒドロゲナーゼを添加することによってアルデヒドと共に N A D H が合成され、乳酸と乳酸デヒドロゲナーゼを添加することによってピルビン酸と共に N A D H が合成される。

40

【 0 0 2 4 】

50

本発明に係る補酵素の製造方法において、 NAD^+ 又は NADH を必要とする酵素反応系に添加される NAD^+ サルベージ合成経路又は NADH サルベージ合成経路に要する酵素としては、耐熱性酵素であることが好ましい。耐熱性酵素は、非耐熱性酵素と比較して、化学的及び熱的安定性に優れているため、酵素反応系内において、より安定して NAD^+ 又は NADH を合成することができる。

【0025】

本発明及び本願明細書において、「耐熱性酵素」とは、60の加熱処理を行った場合でも変性することなく、酵素活性を保持できる酵素を意味する。 NAD^+ を必要とする酵素反応系に添加される耐熱性酵素としては、70の加熱処理を行った場合でも変性することなく、酵素活性を保持できる耐熱性を有するものが好ましい。

10

【0026】

耐熱性酵素としては、天然型の酵素（いずれかの生物が本来有している酵素）であってもよく、天然型の酵素を改変したものであってもよく、人工的に設計・合成されたものであってもよい。天然型の耐熱性酵素は、例えば、超好熱菌又は好熱菌から単離することができる。超好熱菌又は好熱菌としては、例えば、パイロコッカス・ホリコシ (*Pyrococcus horikoshii*)、パイロコッカス・アビッシ (*Pyrococcus abyssi*)、パイロコッカス・グリコボランス (*Pyrococcus glycovorans*)、パイロコッカス・フリオサス (*Pyrococcus furiosus*)、パイロコッカス・ウォセイ (*Pyrococcus wosei*) 等のパイロコッカス属；メタノピラス・カンドラリ (*Methanopyrus kandleri*) 等のメタノピラス属；パイロロバス・フマリ (*Pyrolobus fumarii*) 等のパイロロバス属；スルフォロバス・アシドカルダリウス (*Sulfolobus acidocaldarius*)、スルフォロバス・アイランディカス (*Sulfolobus islandicus*)、スルフォロバス・ソルファタリカス (*Sulfolobus solfataricus*)、スルフォロバス・トウコウダイ (*Sulfolobus tokodaii*) 等のスルフォロバス属；パイロディクティム・アキュルタム (*Pyrodictium occultum*)、パイロディクティム・アビッシ (*Pyrodictium abyssi*)、パイロディクティム・ブロッキ (*Pyrodictium Brockii*) 等のパイロディクティム属；ハイパーサーマス・ブチリカス (*Hyperthermus butylicus*) 等のハイパーサーマス属；パイロバキュラム・アエロフィラム (*Pyrobaculum aerophilum*)、パイロバキュラム・アルセナティカム (*Pyrobaculum arsenaticum*)、パイロバキュラム・オルガノトロファム (*Pyrobaculum organotrophum*) 等のパイロバキュラム属；アエロパイラム・ペルニックス (*Aeropyrum pernix*) 等のアエロパイラム属；サーモコッカス・プロファンダス (*Thermococcus profundus*)、サーモコッカス・コダカレンシス (*Thermococcus kodakarensis*)、サーモコッカス・ガンマトレランス (*Thermococcus gammatolerans*) 等のサーモコッカス属；アクイフェックス・パイロフィラス (*Aquifex pyrophilus*) 等のアクイフェックス属；サーモトーガ・マリティマ (*Thermotoga maritima*)、サーモトーガ・ナフトフィラ (*Thermotoga naphthophila*)、サーモトーガ・レティンガエ (*Thermotoga lettingae*)、サーモトーガ・ネアポリタナ (*Thermotoga neapolitana*)、サーモトーガ・ペトロフィラ (*Thermotoga petrophila*) 等のサーモトーガ属；サーモデスルフォバクテリウム・コムネ (*Thermodesulfobacterium commune*) 等のサーモデスルフォバクテリウム属；サーマス・サーモフィラス (*Thermus thermophilus*)、サーマス・アクアティカス (*Thermus aquaticus*) 等のサーマス属；サーモプラズマ・アシドフィラム (*Thermoplasma acidophilum*)、サーモプラズマ・ヴォルカニウム (*Thermoplasma volcanium*) 等のサーモプラズマ属；ゲオバシラス・ステアロサーモフィラス (*Geobacillus stearothermophilus*) 等のゲオバシラス属；アシジロバス・サッカロボランス (*Acidilobus saccharovorans*) 等のアシジロバス属；スルフォロバス・ソルファタチカス (*Sulfolobus solfataricus*) 等のスルフォロバス属、等に属する微生物が挙げられる。

20

30

40

【0027】

NAD^+ サルベージ合成経路又は NADH サルベージ合成経路が多段階反応の場合、各段階における酵素反応の速度は、酵素反応自体の反応速度と、酵素反応系内における耐熱性酵素の存在量により規定される。そこで、これらの合成経路に使用される各耐熱性酵素は、酵素量の不足による反応効率の低下を招かないよう、反応系内に充分量添加すること

50

が好ましい。特に、反応速度が比較的遅い耐熱性酵素の存在量（ユニット量）は、当該耐熱性酵素による酵素反応が律速とならないように、反応系に充分量添加されることが好ましく、反応速度が比較的速い耐熱性酵素の存在量よりも多くなるように酵素反応系に添加されることも好ましい。酵素反応系内における各耐熱性酵素の存在量を、反応速度とのバランスを考慮して調節することにより、酵素量を抑えつつ、 NAD^+ 又は NADH をより迅速に効率よく合成することができる。なお、本発明に係る補酵素の製造方法において、耐熱性酵素は、酵素反応系が目的とする有機化合物を合成するための酵素反応の反応開始前に酵素反応系に添加してもよく、酵素反応開始後に酵素反応系に添加してもよい。

【0028】

例えば、図1に示す NAD^+ サルベージ合成経路の場合、酵素反応系内に存在する各耐熱性酵素の存在量比（ユニット比）が、ニコチンアミダーゼ = 1 に対して、ニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ = 5 ~ 50、ニコチン酸 - ヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ = 10 ~ 100、 NAD^+ シンターゼ = 200 ~ 600、 ADP - リボースピロホスファターゼ = 1 ~ 2、リボースリン酸ピロホスホキナーゼ = 5 ~ 10 となるように、各耐熱性酵素を酵素反応系に添加することが好ましく、ニコチンアミダーゼ : ニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ : ニコチン酸 - ヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ : NAD^+ シンターゼ : ADP - リボースピロホスファターゼ : リボースリン酸ピロホスホキナーゼ = 1 : 50 : 75 : 500 : 1.2 : 10 となるように、各耐熱性酵素を酵素反応系に添加することがより好ましい。

10

【0029】

NAD^+ サルベージ合成経路及び NADH サルベージ合成経路においては、 ATP を用いた反応が含まれている。そこで、本発明に係る補酵素の製造方法においては、 NAD^+ サルベージ合成経路又は NADH サルベージ合成経路に要する耐熱性酵素に加えて、 ATP を合成する反応（ ATP 合成経路）に要する耐熱性酵素も、 NAD^+ を必要とする酵素反応系又は NADH を必要とする酵素反応系に添加することも好ましい。 ATP 合成経路としては、具体的には、例えば、図3に示すように、 AMP と ATP を出発原料とし、アデニル酸キナーゼ（ ADK ）及びポリリン酸キナーゼ（ PPK ）を用いた経路が挙げられる。1分子の AMP と 1分子の ATP からアデニル酸キナーゼにより 2分子の ADP が合成され、この 2分子の ADP からポリリン酸キナーゼにより 2分子の ATP が合成される。

20

30

【0030】

本発明において用いられる NAD^+ サルベージ合成経路に要する耐熱性酵素、 NADH サルベージ合成経路に要する耐熱性酵素、及び ATP 合成経路に要する耐熱性酵素は、例えば、微生物の代謝系を利用した発現系によって製造できる。当該発現系は、微生物に、耐熱性酵素をコードしている遺伝子（耐熱性酵素遺伝子）が導入された形質転換体内において発現させる発現系であってもよく、いわゆる、セルフリー発現系であってもよい。

【0031】

本発明において酵素反応系に添加する耐熱性酵素を形質転換体内で合成させる場合、一つの形質転換体が発現させる耐熱性酵素は、1種類であってもよく、2種類以上であってもよい。また、 NAD^+ サルベージ合成経路又は NADH サルベージ合成経路に要する全

40

【0032】

耐熱性酵素遺伝子の超好熱菌又は好熱菌からの単離は、当該技術分野で公知の方法に従って行うことができる。具体的には、先ず、超好熱菌又は好熱菌のゲノム DNA を作製した後に、ゲノム DNA を適当な制限酵素で切断し、同一の制限酵素又は共通の切断末端を与える制限酵素で切断したプラスミド又はファージにリガーゼ等を用いて連結することによりゲノム DNA ライブラリーを作製する。次いで、取得目的の耐熱性酵素の塩基配列に基づき設計したプライマーセットを用いて、これらのゲノム DNA ライブラリーを鋳型とした PCR を行うことにより目的の耐熱性酵素遺伝子を得ることができる。或いは、上記塩基配列に基づき設計したプローブを用いて、これらのゲノム DNA ライブラリーをスク

50

リーニングすることによっても、目的の耐熱性酵素遺伝子を得ることができる。得られた耐熱性酵素遺伝子は、コードする耐熱性酵素のアミノ酸配列は変更せずに、宿主細胞において使用頻度の高いコドンへ改変してもよい。なお、コドンの改変は、公知の遺伝子組換え技術によって行うことができる。

【0033】

当該耐熱性酵素遺伝子は、N末端やC末端に、各種タグが付加されたキメラ遺伝子であってもよい。当該タグとしては、例えば、Hisタグ、HA (hemagglutinin) タグ、Mycタグ、及びFlagタグ等の組換えタンパク質の発現又は精製において汎用されているタグを用いることができる。耐熱性酵素をタグが付加された状態で発現させることにより、発現系からの精製や発現量の測定等が簡便になる。

10

【0034】

宿主細胞に耐熱性酵素遺伝子を導入した形質転換体の作製は、公知の方法により又は公知の方法を適宜改変した方法により行うことができる。具体的には、例えば、耐熱性酵素遺伝子を適当なベクターに連結することによって、当該遺伝子を含有する組換えベクターを得、当該組換えベクターを用いて、宿主細胞を形質転換する方法が挙げられる。当該組換えベクターによる宿主細胞の形質転換は、塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法等の公知の方法に従って行うことができる。

【0035】

耐熱性酵素遺伝子の導入に使用されるベクターとしては、形質転換する宿主細胞において耐熱性酵素を発現させ得るものであれば、特に制限されない。例えば、プラスミド、ファージ等のベクターを用いることができる。具体的には、pET11a、pET21a、pUC18、pKK223-3、pBAD、pRCI (Ninh et al., *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, vol.112, p.189-196)、pNit-QT2、pNit-RC2、pTip-QT2、pTip-RC2等が挙げられる。また、当該組換えベクターには、宿主細胞内において耐熱性酵素遺伝子の発現を可能にするためのプロモーターやその他の制御配列(例えば、エンハンサー配列、ターミネーター配列)が含まれていることが好ましい。当該プロモーターとして、具体的には、T7プロモーター、lambda PRプロモーター、PnitAプロモーター、PtipAプロモーター、lacプロモーター、tacプロモーター、pBAD/AraCプロモーター等のプロモーターが挙げられる。

20

30

【0036】

NAD⁺サルベージ合成経路及びNADHサルベージ合成経路に要する耐熱性酵素が複数ある場合、各耐熱性酵素遺伝子の発現を制御するプロモーターは、全て同一種類のものであってもよく、互いに異なる種類のものであってもよい。各耐熱性酵素遺伝子の発現を制御するプロモーターが全て同一種類のものではない場合には、酵素反応系への添加量が比較的多くなる反応速度が遅い耐熱性酵素の発現を制御するプロモーターには発現効率が高いものを用いることが好ましい。酵素反応系への添加量が比較的少なくて済む反応速度が速い耐熱性酵素の発現を制御するプロモーターには、発現効率が比較的低いものを用いてもよい。

【0037】

また、当該組換えベクターには、形質転換された細胞の選択を可能とするために、マーカー遺伝子が含まれていてもよい。当該マーカー遺伝子としては、例えば、宿主の栄養要求性を相補する遺伝子、薬剤に対する抵抗遺伝子等が挙げられる。

40

【0038】

耐熱性酵素遺伝子が導入された形質転換体を得るための宿主細胞としては、特に限定されるものではなく、原核細胞であってもよく、真核単細胞であってもよく、真核多細胞生物の細胞であってもよい。真核多細胞生物の細胞としては、植物細胞であってもよく、昆虫細胞や哺乳細胞等の動物細胞であってもよい。当該宿主細胞としては、培養が容易であり、かつ大量発現に適していることから、微生物であることが好ましい。

【0039】

50

耐熱性酵素遺伝子が導入された形質転換体を得るための宿主細胞としては、特に、非耐熱性微生物が好ましい。非耐熱性微生物を宿主細胞とした形質転換体内において耐熱性酵素を発現させた場合、当該形質転換体を加熱処理することにより、耐熱性酵素の活性は維持させたまま、宿主細胞由来の全てのタンパク質を熱変性させて失活させることができる。このため、耐熱性酵素と共に宿主細胞由来のタンパク質が酵素反応系に持ち込まれた場合でも、意図せぬ副反応を抑制することができる。宿主細胞とする非耐熱性微生物としては、大腸菌；バシラス・サブチリス (*Bacillus subtilis*)、バシラス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*) 等のバシラス属菌；シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*)、シュードモナス・フルオレセンス (*Pseudomonas fluorescense*) 等のシュードモナス属菌；ロドコッカス・エリスロポリス (*Rhodococcus erythropolis*)、ロドコッカス・オパカス (*Rhodococcus opacus*) 等のロドコッカス属菌；サッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 等のサッカロマイセス属菌；シゾサッカロマイセス・ボンベ (*Scizosaccharomyces pombe*) 等のシゾサッカロマイセス属菌；ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 等のピキア属菌、等が好ましく、発現効率が高く、かつ培養を比較的低コストで容易に培養可能なことから、大腸菌が特に好ましい。

10

【0040】

本発明において酵素反応系に添加する耐熱性酵素は、精製されたものであってもよく、粗精製されたものであってもよく、精製されていないものであってもよい。発現系からの耐熱性酵素の精製は、常法により行うことができる。

【0041】

特に、耐熱性酵素を、非耐熱性微生物を宿主細胞とし、耐熱性酵素遺伝子を導入した形質転換体によって合成した場合には、耐熱性酵素を発現させた形質転換体の加熱処理物を、そのまま酵素反応系に添加することができる。加熱処理により、耐熱性酵素は活性を維持しつつ、宿主細胞由来のタンパクが失活するため、意図せぬ副反応を引き起こすことなく、耐熱性酵素を精製せずに加熱処理物をそのまま酵素反応系内に添加することができる。また、加熱処理により形質転換体の細胞構造、特に細胞膜や細胞壁が部分的に破壊され、形質転換体の内外への物質の透過性が向上する。つまり、基質と酵素反応の生産物は死滅菌体（加熱処理後の形質転換体）を透過することができるため、加熱処理物中の耐熱性酵素が形質転換体の死滅菌体内に保持されている場合でも、加熱処理物をそのまま酵素反応系に添加した場合でも、当該酵素反応系内において当該加熱処理物中の耐熱性酵素による酵素反応を行うことができる。さらに、加熱処理物に含まれている宿主細胞由来のADP-リボース、ニコチンアミド、 NAD^+ 、 NADH 、ATP、及びAMP等の成分を、酵素反応系における酵素反応の原料として使用できる。

20

30

【0042】

大腸菌は、比較的細胞壁が加熱処理により破壊されやすい。このため、大腸菌を宿主細胞とし、耐熱性酵素遺伝子を導入した形質転換体の場合には、加熱処理物中の耐熱性酵素は、死滅菌体内に保持されるよりも、死滅菌体外に流出しやすい。加熱処理物を酵素反応系に添加した場合に、死滅菌体外に流出した耐熱性酵素は、酵素反応系内に分散する。耐熱性酵素が死滅菌体内に保持されている場合よりも酵素反応系内を広く分散しているほうが、当該耐熱性酵素による酵素反応の効率がよい。酵素反応系内における反応効率の点からも、細胞壁が加熱処理により破壊され難い非耐熱性微生物よりも、大腸菌のように比較的細胞壁が加熱処理により破壊されやすい非耐熱性微生物のほうが、本発明において用いられる耐熱性酵素を発現させる宿主細胞として好ましい。

40

【0043】

本発明に係る補酵素の製造方法においては、酵素反応系に元々補酵素として添加された NAD^+ 及び/又は NADH の熱分解物であるニコチンアミド及び/又はADP-リボースを基質とすることにより、当該酵素反応系にニコチンアミドやADP-リボースを外添せずとも NAD^+ 又は NADH を合成することができる。また、酵素反応系に、 NAD^+ を一切添加せず、ニコチンアミド等の NAD^+ サルベージ合成経路の出発原料となる化合物のみを添加し、 NAD^+ サルベージ合成経路により合成された NAD^+ のみを酵素反応

50

系内において使用してもよい。同様に、酵素反応系に、NADHを一切添加せず、ニコチンアミド等のNADHサルベージ合成経路の出発原料となる化合物のみを添加し、NADHサルベージ合成経路により合成されたNADHのみを酵素反応系内において使用してもよい。

【0044】

非耐熱性微生物に耐熱性酵素を発現させた形質転換体の加熱処理の条件は、宿主細胞由来のタンパク質は失活するが、目的の耐熱性酵素の活性は維持される条件であれば特に限定されるものではない。例えば、加熱処理は、耐熱性酵素を発現させた形質転換体を、60～90程度で1～30分間加熱する条件で行うことができる。

【0045】

本発明に係る補酵素製造用形質転換体セットは、非耐熱性微生物を宿主とし、当該補酵素のサルベージ合成経路に要する1種又は2種以上の耐熱性酵素をコードしている遺伝子が導入された1種又は2種以上の形質転換体からなることを特徴とする。本発明に係る補酵素製造用形質転換体セットのうち、非耐熱性微生物を宿主とし、NAD⁺サルベージ合成経路に要する1種又は2種以上の耐熱性酵素をコードしている遺伝子が導入された1種又は2種以上の形質転換体からなるものをNAD⁺製造用形質転換体セットという。同様に、非耐熱性微生物を宿主とし、NADHサルベージ合成経路に要する1種又は2種以上の耐熱性酵素をコードしている遺伝子が導入された1種又は2種以上の形質転換体からなるものをNADH製造用形質転換体セットという。

【0046】

NAD⁺サルベージ合成経路に要する耐熱性酵素は、当該NAD⁺製造用形質転換体セットに含まれるいずれかの形質転換体内で発現される。つまり、当該NAD⁺製造用形質転換体セットに含まれる形質転換体を培養することにより、NAD⁺サルベージ合成経路に要する全種類の耐熱性酵素を製造することができる。同様に、NADHサルベージ合成経路に要する耐熱性酵素は、当該NADH製造用形質転換体セットに含まれるいずれかの形質転換体内で発現され、当該NADH製造用形質転換体セットに含まれる形質転換体を培養することにより、NADHサルベージ合成経路に要する全種類の耐熱性酵素を製造することができる。

【0047】

例えば、NAD⁺サルベージ合成経路が図1に示すように、ニコチンアミダーゼ、ニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ、ニコチン酸-ヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ、NAD⁺シンターゼ、ADP-リボスピロホスファターゼ、及びリボースリン酸ピロホスホキナーゼの全6種類の耐熱性酵素を要する場合、当該NAD⁺製造用形質転換体セットは、これらの6種類の耐熱性酵素遺伝子が全て導入された1種類の形質転換体からなってもよく、それぞれの耐熱性酵素遺伝子がそれぞれ異なる形質転換体に導入された6種類の形質転換体からなってもよい。また、これら6種類の耐熱性酵素遺伝子のうち、3種類が導入された形質転換体と、残りの3種類が導入された形質転換体との2種類の形質転換体からなってもよい。

【0048】

当該NAD⁺製造用形質転換体セット及びNADH製造用形質転換体セットには、さらに、ATP合成経路に要する1種又は2種以上の耐熱性酵素をコードしている遺伝子が導入された1種又は2種以上の形質転換体が含まれていてもよい。

【0049】

当該補酵素製造用形質転換体セットに含まれる形質転換体としては、前記の通りのものを用いることができ、大腸菌を宿主細胞とするものが好ましい。

【0050】

当該補酵素製造用形質転換体セットに含まれる形質転換体は、長期保存に適したグリセロールストックの状態であってもよく、寒天培地でコロニーを形成させた状態であってもよい。また、培養用培地にてある程度培養させた培養液の状態（懸濁液）であってもよく、培養後の湿菌体を加熱処理されたものであってもよい。

10

20

30

40

50

【実施例】

【0051】

次に、実施例等により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの例によって限定されるものではない。

【0052】

< HPLC分析 >

NAD⁺、ADP-リボース、ニコチンアミド、ニコチン酸、ニコチン酸モノヌクレオチド、及びデアミノNAD⁺は、5C₁₈AR-IIカラム(4.6mm(内径)×250mm、ナカライテスク社製)を用いてHPLCにて定量分析した。溶出には、溶離液Aとして50mMリン酸カリウム緩衝液(pH6.5)、溶離液Bとして同緩衝液に25% (v/v)メタノールと5mM1-オクタンスルホン酸ナトリウムを溶解させた溶液を用いたグラジエント溶出を用いた。溶離液の流速は0.5mL/minとし、溶出開始から5分間は溶離液A単独での溶出、その後5~11分までの間に溶離液Bの混合比率を0から100% (v/v)にまで上昇させた後、さらに、溶離液B単独で6分間の溶出を行った。カラム温度は40℃に保ち、溶出液は254nmでモニターした。

ATP、ADP、及びAMPの定量は、HILICカラム(4.6mm(内径)×250mm、ナカライテスク社製)を用いたHPLC分析により実施した。溶離液として、20mMリン酸カリウムバッファー(pH7.0)とアセトニトリルを当容量ずつ混合した溶液を用い、流速1.0mL/minで溶出した。カラム温度は40℃に保ち、溶出液は254nmでモニターした。

【0053】

[参考例1]

1分子のNAD⁺が熱分解されると、1分子のニコチンアミドと1分子のADP-リボースが生産される(図4)。

終濃度1mMのNAD⁺溶液を70℃で3時間インキュベートした後、5C₁₈AR-IIカラムを用いたHPLC分析に供したところ、NAD⁺のほかに2本のピークが観察された。NAD⁺の構成単位となる各種化合物の分析結果と比較したところ、ニコチンアミド、ADP-リボースがそれらのピークと同じ保持時間を示すことが明らかとなった。次に、NAD⁺の熱分解を経時的に追跡したところ、分解に伴ってニコチンアミド、ADP-リボースが化学量論的に蓄積することが明らかとなった(図5)。この結果より、ニコチンアミド及びADP-リボースの両物質は、NAD⁺に比して熱に対する安定性に優れることが示唆され、サルベージ合成の出発物質として利用可能であると判断された。

なお、ここで示された分解様式は、Chenaultらの総説(Chenault and Whitesides, Applied Biochemistry and Biotechnology, 1987, vol.14, p.147-197)において、アルカリ触媒下におけるNAD⁺分解スキームとして提唱されている知見ともよく合致した。

【0054】

[実施例1]

< NAD⁺サルベージ合成経路のデザイン >

ニコチンアミドを出発物質としたNAD⁺サルベージ合成経路をデザインしたところ、図1及び2に示す2ルートが考えられた。図1に示すNAD⁺サルベージ合成経路に必要とされる6種類の酵素について、超好熱菌又は好熱菌由来の酵素の中から表1に示す酵素を選択した。また、合わせて、図3に示すATP合成経路に必要とされる2種類の酵素と、グルコースデヒドロゲナーゼについて、超好熱菌又は好熱菌由来の酵素の中から表1に示す酵素を選択した。なお、グルコースデヒドロゲナーゼは、合成されたNAD⁺の定量のために使用するものである。表1中、「GI number」は、GenBank(NCBI(National Center for Biotechnology Information)が提供する塩基配列データベース)のアクセッション番号である。

【0055】

10

20

30

40

【表 1】

酵素名	EC 番号	由来	略称	GI number	発現ベクター (プロモーター)
ニコチンアミダーゼ	3.5.1.19	<i>Thermoplasma acidophilum</i>	TaNAase	499203341	pET21a (T7)
ニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ	6.3.4.21	<i>Thermus thermophilus</i> HB8	TtNAPRT	55980586	pET11a (T7)
ニコチン酸-ヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ	2.7.7.18	<i>Thermus thermophilus</i> HB8	TtNMAT	55981749	pET11a (T7)
NAD ⁺ シンターゼ	6.3.1.5	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	GsNADS	696475119	pET21a (T7)
ADP-リボースピロホスファターゼ	3.6.1.13	<i>Thermus thermophilus</i> HB8	TtADPRP	55771910	pET11a (T7)
リボースリン酸ピロホスホキナーゼ	2.7.6.1	<i>Thermus thermophilus</i> HB8	TtRPK	55981518	pET11a (T7)
アデニル酸キナーゼ	2.7.4.3	<i>Thermus thermophilus</i> HB8	TtADK	55773053	pET11a (T7)
ポリリン酸キナーゼ	2.7.4.1	<i>Thermus thermophilus</i> HB27	TtPPK	46196569	pET21a (T7)
グルコースデヒドロゲナーゼ	1.1.1.118	<i>Sulfolobus solfataticus</i>	SsGDH	3786221	pRCI (lambda PR)

10

20

【0056】

サーモプラズマ・アシドフィラムのニコチンアミダーゼは、ニコチンアミダーゼ活性があり、大腸菌内での異種発現も可能であるとの報告があるアシジロバス・サッカロポランス由来ニコチンアミダーゼ(GI:503031789)のアミノ酸配列をクエリ配列としてBLAST検索を行った結果に見出された酵素であり、当該酵素をコードする遺伝子は、サーモプラズマ・アシドフィラムのゲノムDNAよりPCR法によって単離した。単離された酵素遺伝子を大腸菌に導入し、得られた形質転換体内において当該酵素を発現させたところ、60においてニコチンアミダーゼ活性を備えることを確認した。

30

また、デアミノNAD⁺のアミノ化酵素(NADシンターゼ)は、表1に記載の酵素に代えて、サーマス・サーモフィラス由来のNADシンターゼを用いてもよい。

なお、表1中のTtNMATは、ニコチン酸モノヌクレオチド(NaMN)のみならず、ニコチンアミドモノヌクレオチド(NMN)も基質としうる酵素である。

【0057】

<形質転換体の作製>

表1に記載の耐熱性酵素について、各耐熱性酵素遺伝子を大腸菌に導入して形質転換体(組換え大腸菌)を作製した。

40

表1に記載の耐熱性酵素のうち、サーマス・サーモフィラスHB8由来のものは、いずれも理化学研究所より提供を受けた同菌の1遺伝子発現プラスミドライブラリー(Yokoyama, et al., Nature Structural Biology, 2000, vol.7, p.943-945)に含まれるものである。同ライブラリーの発現ベクターはpET11a(Novagen社製)及びその誘導体をバックボーンとして作製されたものであり、目的遺伝子はT7プロモーター制御下に配置され、IPTGによる発現誘導を受ける。

サーマス・サーモフィラスHB27由来のポリリン酸キナーゼ(TtPKK)及びサーモプラズマ・アシドフィラム由来ニコチンアミダーゼ(TaNAase)は、各微生物のゲノムDNAよりPCR増幅した当該遺伝子をpET21aに連結し、同様にT7プロ

50

モーター制御下で発現させた。

これらの遺伝子発現ベクターは、全て *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS (Novagen社製) に導入し、形質転換体を作製した。

【0058】

スルフォロブス・ソルファタチカス由来グルコースデヒドロゲナーゼ (SsGDH) 遺伝子は、pRCIの λ PRプロモーター制御下に連結し、*E. coli* DH5 株に導入し、形質転換体を作製した。SsGDH遺伝子の発現は、培養温度を42にシフトさせることによって誘導を行った。

【0059】

組換え大腸菌は全て100 μ g/mLのアンピシリンを含むLuria-Bertani培地を用い、37で好氣的に培養した。*E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysSの培養では、さらに30 μ g/mLのクロラムフェニコールを培地に添加した。対数増殖後期に培養液に0.2 mM IPTGの添加、若しくは熱誘導(42)により、目的酵素遺伝子の発現誘導を行った。

【0060】

<粗酵素液の調製>

目的の耐熱性酵素を発現させた組換え大腸菌の湿菌体を200 mg (wet cells) / mLとなるように100 mM HEPES-NaOH (pH 7.0) に懸濁した。得られた懸濁液を超音波破碎処理に供することにより菌体を破碎し、無細胞抽出液を得た。当該無細胞抽出液に対し、70、30分間の熱処理を施し、宿主由来タンパク質を変性させ、失活させた。熱処理後の懸濁液を遠心分離処理し、細胞残さと変性タンパク質を取り除いた上清を粗酵素液として活性測定に用いた。

【0061】

<酵素活性測定>

活性測定には400 mM HEPES-NaOH (pH 8.0) を使用し、反応は全て60で実施した。各酵素の活性は、図1に示すNAD⁺サルベージ合成経路において下流に位置する酵素とカップリングさせることにより生じるNAD⁺を、さらにSsGDHによって還元し、蓄積するNADHの濃度を340 nmにおける吸収をモニターすることによって測定した。各酵素の活性は、本測定条件下で1分間に1 μ molの基質消費を触媒する量を1ユニット(U)と定義して表す。

【0062】

TaNaseの活性測定は、400 mM HEPES-NaOH (pH 8.0)、1 mM グルコース、60 mM NH₄Cl₂、10 mM MgCl₂、3 mM ATP、1 mM ポリリン酸(平均鎖長60)、0.2 mM ホスホリボシルピロリン酸 (PRPP) からなる反応液中で実施した。当該反応溶液に、TaNase、TtNAPRT、TtNMAT、GsNADS、及びSsGDHの粗酵素液を添加し、60で3分間プレインキュベートした。なおこの際、TtNAPRT、TtNMAT、GsNADS、SsGDHは、TaNaseに対して活性値において過剰量となるように添加し、下流酵素の反応がNADH合成反応の律速段階とならないようにした。プレインキュベーション後、終濃度0.2 mMのニコチンアミドを添加し、340 nmにおける吸光度の上昇をモニターした。反応速度の算定には、同波長におけるNADHのモル吸光度係数6.2 mM⁻¹ cm⁻¹を使用した。

【0063】

同様にTtNAPRTの活性測定は、TaNaseを添加しないことを除き、同じ組成の反応液で実施した。プレインキュベーションの後に、基質として0.2 mMのニコチン酸を加えることにより反応を開始させた。同様にTtNMAT、GsNADSについても、各酵素の基質(ニコチン酸モノヌクレオチド(NaMN)、デアミノNAD) 0.2 mMを用いて活性測定を行った。また、TtADPRP、TtRPKの活性も、それぞれ0.2 mMのADP-リボース、リボース5-リン酸を基質とし、TtNAPRT、TtNMAT、GsNADS、又はSsGDHとのカップリング反応速度を定量することによ

10

20

30

40

50

って測定した。

【0064】

また、 NAD^+ 存在下における各酵素の活性を評価する場合には、 400 mM $\text{HEPES} - \text{NaOH}$ ($\text{pH} 8.0$) 中で各酵素とその基質を 60°C でインキュベートし、生産物の濃度を HPLC で測定した。

TtADK 、 TtPPK については、これらの粗酵素液を 400 mM $\text{HEPES} - \text{NaOH}$ ($\text{pH} 8.0$) 中で、 10 mM MgCl_2 、 0.2 mM ATP 、 3.0 mM AMP 、 1 mM ポリリン酸と共に 60°C でインキュベートし、 ATP 蓄積量及び AMP 減少量を HPLC で測定した。

【0065】

< NAD^+ サルベージ合成試験 >

NAD^+ サルベージ合成試験は、 400 mM $\text{HEPES} - \text{NaOH}$ ($\text{pH} 8.0$)、 60 mM NH_4Cl_2 、 10 mM MgCl_2 、 4 mM NAD^+ 、 3 mM ATP 、 1 mM ポリリン酸 (平均鎖長 60)、 0.2 mM ADP - リボース、 0.2 mM ニコチンアミドからなる反応液中で実施した。

反応液量 0.5 mL に対し、 TaNase 、 TtNAPRT 、 TtNMAT 、 GsNADS 、 TtADPRP 、 TtRPK 、 TtADK 、及び TtPPK を個別に発現させた組換え大腸菌からそれぞれ調製した粗酵素液を混合し、各酵素の終濃度がそれぞれ 0.02 、 0.18 、 0.25 、 0.51 、 0.02 、 0.03 、 0.05 、及び 0.05 U/mL となるように添加した。また、対照試験として、組換え大腸菌や粗酵素液を含まない反応液を用意し、これらを 60°C でインキュベートした。経時的にサンプリングを行い、反応液中の NAD^+ を HPLC で定量した。

【0066】

$\text{HEPES} - \text{NaOH}$ (400 mM 、 $\text{pH} 8$) 中、 60°C にて 4 mM の NAD^+ をインキュベートしたところ、その分解速度は $50\text{ }\mu\text{M/min}$ 程度と見積もられた。そこで、酵素活性測定法に示した反応条件のもと、 NADH 生産速度を吸光度変化によってモニターしつつ、各酵素の添加量を調節することにより、 ADP - リボース、ニコチンアミド各 0.2 mM から $50\text{ }\mu\text{M/min}$ の速度で NADH を合成するために必要な酵素の濃度を見積もった。

【0067】

一方、 HPLC 分析により 4 mM NAD^+ 存在下での各酵素の活性測定を行った。この結果、ニコチン酸のホスホリボシル化を触媒する TtNAPRT が NAD^+ により顕著な阻害を受けることが明らかとなった。図 6 に、横軸に示す濃度の NAD^+ を含む 400 mM $\text{HEPES} - \text{NaOH}$ ($\text{pH} 8.0$) 中で TtNAPRT を、各 0.2 mM の PRPP 、 ATP 、及びニコチン酸とともに 60°C でインキュベートした後、反応液中のニコチン酸モノヌクレオチド (NaMN) 濃度を HPLC で定量し、活性値 (NAD^+ を含まない反応液中での活性を 100% とした場合の相対活性値) を算出した結果を示す。同条件下での TtNAPRT 活性は NAD^+ 非存在下のその約 $1/4$ と見積もられたことから、本酵素に関しては吸光度測定に基づき決定した酵素濃度の 4 倍量を添加することとした。

【0068】

< ATP 合成経路とのカップリング >

図 1 の NAD^+ サルベージ合成経路では、 NAD^+ を 1 分子合成するに当たり 3 分子の ATP が消費され、 3 分子の AMP が放出される。そこで、 TtADK と TtPPK によるポリリン酸をリン酸基供与源とした AMP からの ATP 合成経路を NAD^+ サルベージ合成経路にカップリングさせた。この際の酵素量は、 NAD^+ 分解速度から必要と見積もられる速度 ($150\text{ }\mu\text{M/min}$) に比して、過剰量となるように設定した。

【0069】

こうして決定された濃度の活性値を有する粗酵素液、又は当該粗酵素液と同等の酵素活性値を有する耐熱性酵素を含む組換え大腸菌の懸濁液を熱処理 (70°C 、 30 分間) に供

10

20

30

40

50

したものを加えた反応液中で、60℃にて4 mM NAD⁺をインキュベートし、その濃度変化を経時追跡した(図7)。この結果、少なくとも6時間までの間において、酵素非添加時に比べNAD⁺の見かけ上の分解速度が大きく低下し、初発濃度に近い濃度のNAD⁺が維持され続けることが確認された。すなわち、NAD⁺サルベージ合成経路とATP合成経路に要する耐熱性酵素を添加することにより、NAD⁺の熱分解物からNAD⁺が再合成され、見掛け上、系内のNAD⁺濃度は低下しないこと、よって、NAD⁺を必要とする酵素反応系にNAD⁺サルベージ合成経路に要する耐熱性酵素を添加することにより、NAD⁺を外添せずともNAD⁺の熱分解による濃度低下を抑制することができ、ひいては目的の有機化合物の合成を長時間安定して行えることが確認された。

【0070】

[実施例2]

NAD⁺サルベージ合成経路及びATP合成経路に要する耐熱性酵素を用いて、NAD⁺サルベージ合成試験を行った。使用した各種耐熱性酵素は、実施例1で用いたものを用いた。

【0071】

具体的には、NAD⁺サルベージ合成反応を、300 mM HEPES-NaOH (pH 8.0)、60 mM NH₄Cl₂、10 mM MgCl₂、1 mM ポリリン酸(平均鎖長60)、4 mM NAD⁺、3 mM ATP、0.2 mM ニコチンアミド、0.2 mM ADP-リボース、及び実施例1で用いた各種耐熱性酵素の混合物である酵素カクテルを含む反応液2 mL中で実施した。なお、当該反応液に含まれている耐熱性酵素の最終濃度はそれぞれ、TaNaseが0.12 U (0.6 U/mL)、TtNAPRTが0.26 U (0.13 U/mL)、TtNMATが1.6 U (0.8 U/mL)、GsNADSが10 U (5 U/mL)、TtADPRPが0.12 U (0.6 U/mL)、TtRPKが0.2 U (0.1 U/mL)、TtADKが18 U (9 U/mL)、TtPPKが10 U (5 U/mL)であった。

【0072】

調製した反応液を、60℃でインキュベートした。また、対照試験として、酵素カクテルを含まない反応液を用意し、同様に60℃でインキュベートした。反応開始から3時間ごとにサンプリングを行い、反応液中のNAD⁺をHPLCで定量した。反応液中のNAD⁺量の経時変化を図8に示す。図中、「酵素有り」が酵素カクテルを添加した反応液の結果を示し、「酵素なし」が酵素カクテルを添加していない反応液の結果を示す。図8に示すように、耐熱性酵素を添加していない反応液では、NAD⁺はインキュベート開始直後から時間経過と共に徐々に低下した。これに対して、NAD⁺サルベージ合成経路及びATP合成経路に要する耐熱性酵素を添加した反応液では、インキュベート開始から21時間くらいまでは、NAD⁺の量はさほど低下しなかった。これらの結果から、当該反応液中では、NAD⁺サルベージ合成反応によりNAD⁺の分解物からNAD⁺が合成されていること、NAD⁺の合成に必要なATPもATP合成反応により補給されていることが確認できた。

【0073】

[実施例3]

NADHサルベージ合成経路及びATP合成経路に要する耐熱性酵素を用いて、NADH合成試験を行った。使用した各種耐熱性酵素は、実施例1で用いたものを用いた。

【0074】

具体的には、NADHサルベージ合成反応を、300 mM HEPES-NaOH (pH 8.0)、60 mM NH₄Cl₂、10 mM MgCl₂、1 mM ポリリン酸(平均鎖長60)、4 mM NADH、50 mM グルコース、3 mM ATP、0.2 mM ニコチンアミド、0.2 mM ADP-リボース、及び実施例1で用いた各種耐熱性酵素の混合物である酵素カクテルを含む反応液2 mL中で実施した。なお、当該反応液に含まれている耐熱性酵素の最終濃度はそれぞれ、TaNaseが0.12 U (0.6 U/mL)、TtNAPRTが0.26 U (0.13 U/mL)、TtNMATが1.6 U (

10

20

30

40

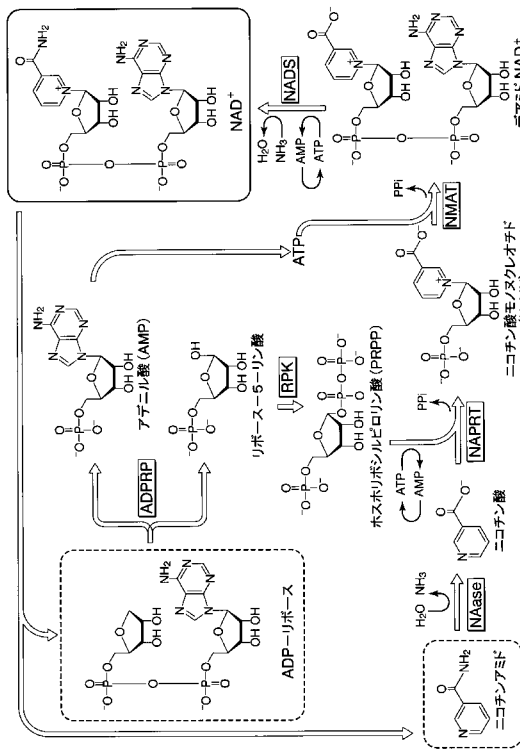
50

0.8 U/mL)、GsNADSが10 U (5 U/mL)、TtADPRPが0.12 U (0.6 U/mL)、TtRPKが0.2 U (0.1 U/mL)、TtADKが18 U (9 U/mL)、TtPPKが10 U (5 U/mL)、SsGDHが10 U (5 U/mL)であった。

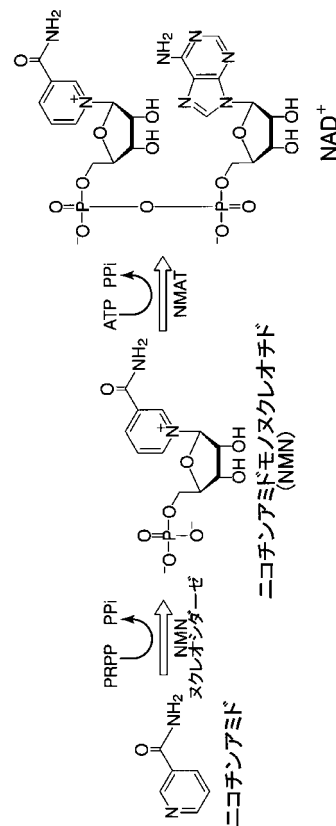
【0075】

調製した反応液を、60 でインキュベートした。また、対照試験として、酵素カクテルを含まない反応液を用意し、同様に60 でインキュベートした。反応開始から3時間ごとにサンプリングを行い、反応液中のNADHをHPLCで定量した。反応液中のNADH量の経時的变化を図9に示す。図中、「酵素有り」が酵素カクテルを添加した反応液の結果を示し、「酵素なし」が酵素カクテルを添加していない反応液の結果を示す。図9に示すように、耐熱性酵素を添加していない反応液では、NADHはインキュベート開始直後から時間経過と共に徐々に低下した。これに対して、NADHサルベージ合成経路及びATP合成経路に要する耐熱性酵素を添加した反応液では、インキュベート開始から15時間くらいまでは、NADHの量はほとんど低下していなかった。これらの結果から、当該反応液中では、NADHサルベージ合成反応によりNADHの分解物からNADHが合成されていること、NADHの合成に必要なATPもATP合成反応により補給されていることが確認できた。

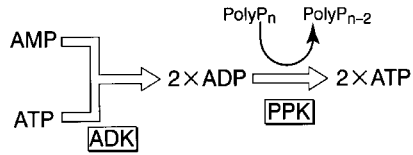
【図1】



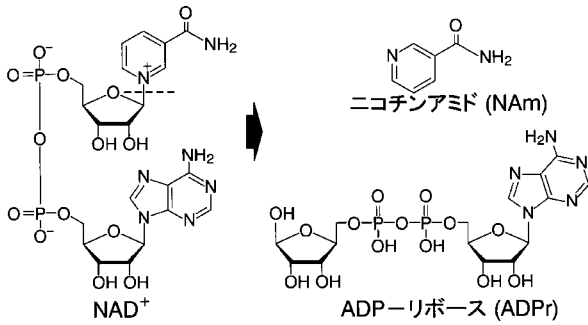
【図2】



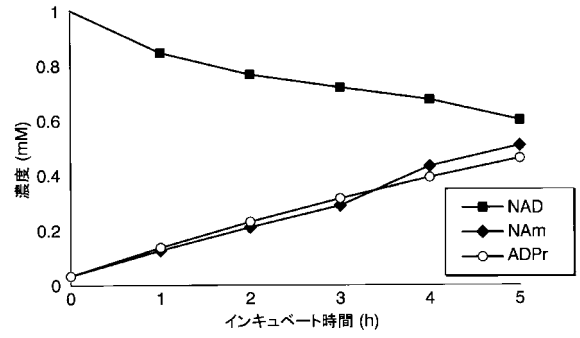
【 図 3 】



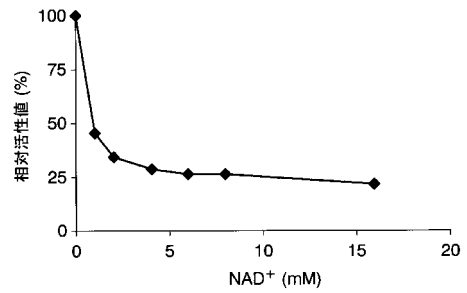
【 図 4 】



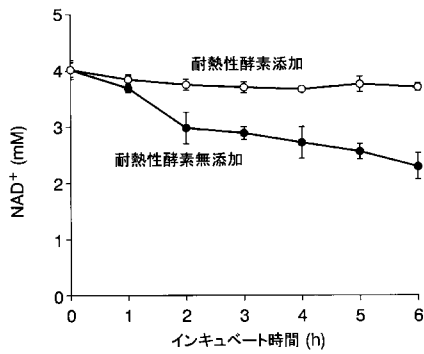
【 図 5 】



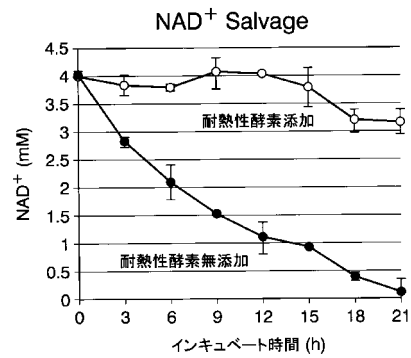
【 図 6 】



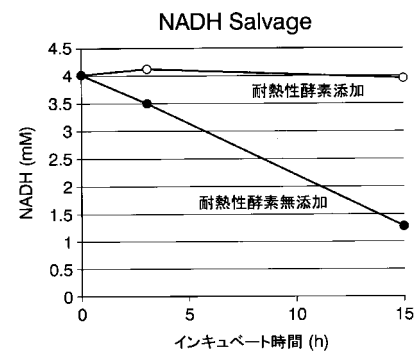
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2016/054872
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12P19/32(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N15/09(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) C12P19/32, C12N1/21, C12N15/09 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 1996-2016 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GAZZANIGA F. et al., Microbial NAD Metabolism: Lessons from Comparative Genomics, MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS, 2009, vol.73, no.3, pp.529-541, Fig.4	1-18
A/X	JP 63-185378 A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), 30 July 1988 (30.07.1988), claims & US 4921786 A & EP 260137 A2	1-11,13-18/ 12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 11 May 2016 (11.05.16)		Date of mailing of the international search report 24 May 2016 (24.05.16)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/054872

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A/Y	Yumi MORIMOTO et al., "Alteration of the coenzyme specificity of the malic enzyme from <i>Thermococcus kodakarensis</i> KOD1 and its utilization in synthetic metabolic pathway", Abstracts of the Annual Meeting of the Society for Biotechnology, Japan, 2012, vol.64, page 230, 4Ha06, column of 'background'	1-17/18
A/Y	YE X. et al., Synthetic metabolic engineering-a novel, simple technology for designing a chimeric metabolic pathway, <i>Microbial Cell Factories</i> , 2012, vol.11, 120, Fig. 1	1-17/18
A	NINH PH. et al., Assembly and Multiple Gene Expression of Thermophilic Enzymes in <i>Escherichia Coli</i> for In Vitro Metabolic Engineering, <i>Biotechnology and Bioengineering</i> , Available online 26 September 2014, vol.112, no.1, pp.189-196, Figs.1-2	1-18
X/Y	STEKHANOVA TN. et al., Nicotinamidase from the Thermophilic Archaeon <i>Acidilobus saccharovorans</i> : Structural and Functional Characteristics, <i>Biochemistry (Moscow)</i> , 2014, vol.79, no.1, pp.54-61, abstract	12,16,17/18
X/Y	YAMAGUCHI F. et al., Stable Ammonia-specific NAD Synthetase from <i>Bacillus stearothermophilus</i> : Purification, Characterization, Gene Cloning, and Applications, <i>Bioscience Biotechnology and Biochemistry</i> , 2002, vol.66, no.10, pp.2052-2059, abstract	12,16,17/18
P,X	HONDA K. et al., In vitro metabolic engineering for the salvage synthesis of NAD ⁺ , <i>Metabolic Engineering</i> , Available online 18 February 2016, vol.35, pp.114-120, entire text	1-18
P,X	Naoya HARA et al., "In vitro Taisha Kogaku o Mochiita NAD + Salvage Keiro no Kochiku", Annual Meeting of JSBBA Koen Yoshishu (web), 05 March 2015 (05.03.2015), vol.2015, page 2A34P18, entire text	1-18
P,X	Kosuke HONDA, "Tainetsusei Koso o Mochiita Nicotinamide Hokoso no Anteika Gijutsu no Kaihatsu", Osaka University, New Technology Presentation Meetings Tojitsu Shiryo, 14 July 2015 (14.07.2015), entire text	1-18

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 6 / 0 5 4 8 7 2													
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12P19/32(2006,01)i, C12N1/21(2006,01)i, C12N15/09(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. C12P19/32, C12N1/21, C12N15/09															
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2016年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2016年	日本国実用新案登録公報	1996-2016年	日本国登録実用新案公報	1994-2016年				
日本国実用新案公報	1922-1996年														
日本国公開実用新案公報	1971-2016年														
日本国実用新案登録公報	1996-2016年														
日本国登録実用新案公報	1994-2016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) CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)															
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													
A	GAZZANIGA F. et al., Microbial NAD Metabolism: Lessons from Comparative Genomics, MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS, 2009, vol. 73, no. 3, pp. 529-541, Fig. 4	1-18													
A/ X	JP 63-185378 A (旭化成工業株式会社) 1988.07.30, & US 4921786 A & EP 260137 A2, 特許請求の範囲	1-11, 13-18/ 12													
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。															
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>の日の後に公表された文献</td> </tr> <tr> <td>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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)</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&」同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>				* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献	「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	「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	「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	「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	「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)	「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	「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献	「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献														
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	「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														
「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	「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														
「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)	「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														
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献														
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願															
国際調査を完了した日 11.05.2016		国際調査報告の発送日 24.05.2016													
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) 福岡 信子 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4N 3539												

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 6 / 0 5 4 8 7 2
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
A/ Y	森本有美 他, Thermococcus kodakrensis KOD1 由来 malic enzyme の補酵素要求性改変と合成代謝経路への利用, 日本生物工学大会講演要旨集, 2012, vol.64, p.230, 4Ha06, 「背景」の欄	1-17/ 18
A/ Y	YE X. et al., Synthetic metabolic engineering—a novel, simple technology for designing a chimeric metabolic pathway, Microbial Cell Factories, 2012, vol.11, 120, Fig.1	1-17/ 18
A	NINH PH. et al., Assembly and Multiple Gene Expression of Thermophilic Enzymes in Escherichia Coli for In Vitro Metabolic Engineering, Biotechnology and Bioengineering, Available online 26 September 2014, vol.112, no.1, pp.189-196, Figs.1-2	1-18
X/ Y	STEKHANOVA TN. et al., Nicotinamidase from the Thermophilic Archaeon Acidilobus saccharovorans: Structural and Functional Characteristics, Biochemistry (Moscow), 2014, vol.79, no.1, pp.54-61, abstract	12, 16, 17/ 18
X/ Y	YAMAGUCHI F. et al., Stable Ammonia-specific NAD Synthetase from Bacillus stearothermophilus: Purification, Characterization, Gene Cloning, and Applications, Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2002, vol.66, no.10, pp.2052-2059, abstract	12, 16, 17/ 18
P, X	HONDA K. et al., In vitro metabolic engineering for the salvage synthesis of NAD ⁺ , Metabolic Engineering, Available online 18 February 2016, vol.35, pp.114-120, 全文	1-18
P, X	原直矢 他, In vitro 代謝工学を用いた NAD ⁺ サルベージ経路の構築, 日本農芸化学大会講演要旨集 (web) , 2015.03.05, vol.2015, p.2A34P18, 全文	1-18
P, X	本田孝祐, 耐熱性酵素を用いたニコチンアミド補酵素の安定化 技術の開発, 大阪大学 新技術説明会 当日資料, 日時: 2015年7月14日, 全文	1-18

フロントページの続き

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

Fターム(参考) 4B064 AF28 CA21 DA16 DA20
4B065 AA26X AB01 BA02 CA23

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。