

耐熱性酵素を用いたバイオプロセスプラットフォームの開発

Development of a Bioprocess Platform Using Thermostable Enzymes

廣田 隆一*, 黒田 章夫
RYUICHI HIROTA and AKIO KURODA

広島大学大学院先端物質科学研究科分子生命機能科学専攻

TEL/FAX: 082-424-7047

* E-mail: hirota@hiroshima-u.ac.jp

Department of Molecular Biotechnology, Graduate School of Advanced Sciences of Matter, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8530, Japan

キーワード: バイオプロセス, 耐熱性酵素, 大腸菌, 補酵素再生系

Key words: bioprocess, thermostable enzyme, *Escherichia coli*, cofactor regeneration system

(原稿受付 2011年10月24日/原稿受理 2011年11月15日)

1. はじめに

我々の物質文明を支える化学工業プロセスは、高温・高圧の条件下での化学反応によるものが通常であり、エネルギー大量消費型・CO₂大量発生型の生産形態である。一方、バイオプロセスは穏和な条件で運転可能でCO₂発生が少ない環境調和型プロセスであり、今後の循環型社会形成のための主要技術として利用される事が期待されている。また、バイオプロセスは多様な生体反応を活用できるため、様々なものづくりが可能になると期待される。特に、次世代シークエンス技術をはじめとする大規模ゲノム解析から次々に発見される遺伝子資源を利用すれば、どれほど多様なものが作れるかと期待に胸は膨らむ。しかしながら、現在工業プロセスで利用されている生体反応の65%は単純な加水分解反応であるといわれ²⁾、有用な生体反応を十分に活用できていないのが現状である。この理由には種々あるかと思われるが、反応触媒としての酵素の安定性が化学触媒に比べて不安定でありその調製に労力を要することや、ATP依存性酵素や酸化還元酵素の反応に必要なATPやNAD(P)Hなどの補酵素が一般に高価であることなどが大きな要因として挙げられよう。我々は、これらの問題を克服できる技術を作ることができないかと考え、耐熱性酵素を利用した反応プラットフォームの構築を行った。現時点ではまだ開発途上の部分もあるが、本技術では、酵素調製の労力を大幅に省くことができるうえ、副反応物生成による影響もなく高効率で目的化合物を合成できる。また、補酵素の問題を回避できる安価なATP、NAD(P)H再生系も整いつつある。よって、このプラットフォームシステムを利用することで、現在バイオプロセスへの利用に制約がある生体反応も利用できる可能性がある。本稿では、このプラットフォームシステムを構成するホー

ルセル生体触媒の作製と補酵素再生系について解説する。また、実際のものづくりに利用した例についても併せて紹介したい。

2. 耐熱性酵素を使ったシンプルなホールセル生体触媒作製方法

このプラットフォーム技術におけるホールセル生体触媒作製の工程は以下の通りである。まず、大腸菌に目的の反応を行う耐熱性酵素を発現させ、その後菌体を丸ごと加熱して大腸菌由来の酵素を失活させることにより、必要な反応系だけを得る(図1)。加熱後の細胞膜には小孔が形成され、基質や生成物が透過できるようになるため、菌体はそのまま反応に使える。さらに、耐熱性タンパク質は細胞内の狭い空間内に高密度で保持されるので、高い反応効率を得られる。また、大腸菌由来酵素は失活し、副反応は完全にシャットアウトされるため、目的生成物のみを高い収率で得ることができる。つまり、酵素精製などの工程は一切要せず、大腸菌内での耐熱性タンパク質の発現と熱処理という非常にシンプルな操作だけで狙った代謝系のみを機能させるホールセル生体触媒を作ることが出来る。

この方法の着想は、バクテリアが作るリン酸ポリマーであるポリリン酸の研究に由来する。ポリリン酸とは、数十から数百の無機リン酸が高エネルギーリン酸結合で直鎖状につながった生体無機ポリマーである(図2A)。黒田らは、活性汚泥中に大量に蓄積されたポリリン酸をリン資源として回収するため、様々な回収方法を検討していたところ、70°Cで短時間汚泥を加熱すると菌体は溶菌せずに、細胞膜上の損傷部分からポリリン酸だけが上清中に放出されることを発見した¹⁾。この技術を使ったリンの回収方法については、別途総説等³⁾を参照して

いただきたいが、この現象を利用すれば、逆に細胞内に物質を導入することができるのではないかと考えた。さらに、耐熱性酵素を利用すれば、加熱後は狙った耐熱性酵素の反応系だけが生き残る。つまり、大腸菌に目的の反応を行う耐熱性酵素を発現させ、その後菌体を加熱すれば、この菌体はホールセル生体触媒として機能するはずである。そこで、このアイデアの実証を、ポリリン酸キナーゼ (PPK) とポリリン酸を使った ATP 再生システムの構築により行った⁷⁾。

3. 耐熱性ポリリン酸キナーゼを用いた ATP 再生系の構築

ATP や NAD(P)H などの補酵素は高価であるため、これらを反応等量添加するプロセスは経済的に成立しない。そこで、一般的には酵素反応を用いて安価な基質から補酵素類を再生する、いわゆる補酵素再生系が用いられる。ATP の再生系としては、既にホスホエノールピルビン酸/ピルビン酸キナーゼ、クレアチンリン酸/クレアチンキナーゼ、アセチルリン酸/酢酸キナーゼを用いた ATP 再生方法が報告されている¹⁾。しかし、いずれのリン酸ドナー物質も価格が ATP と同等かそれより高い上、安定性に欠けるといった問題がある。ポリリン酸/PPK を用いた ATP 再生系はこれらの問題を克服できる反応系として期待されている^{10,13,22)}。

PPK は ATP の γ 位のリン酸を可逆的にポリリン酸に

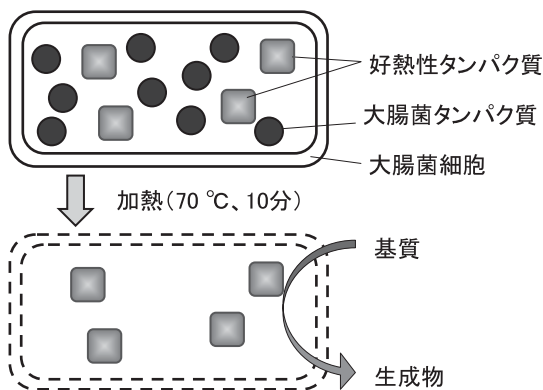


図1. 大腸菌ホールセル生体触媒調製方法の概念図

転移させる酵素であるが、ポリリン酸と ADP が十分に存在するときには、ADP にポリリン酸のリン酸基を転移させて ATP を再生させる (図 2B)。ポリリン酸は、リン酸を加熱することでも合成できるため、その価格は ATP の 1/1000 程度と非常に安価である。また、安定性も高く、食品添加物にも用いられているように安全である。この様な利点のために、他のシステムよりも優れた ATP 再生方法として利用される事が期待されており、既に大腸菌の PPK による ATP 再生系を用いた *N*-アセチルラクタサミンの合成などが報告されている¹³⁾。そこで我々は、耐熱性 PPK を使った ATP 再生ホールセル生体触媒が、前述の方法で作製できるか検討した。

まず、耐熱性の PPK はこれまで報告が無かったため、好熱菌 *Thermus thermophilus* HB27 株から新規に PPK (PPK^T) を得た。生化学的解析から PPK^T の至適温度は 70°C であり、最適な反応条件下での ATP 生成に対する PPK^T の比活性は 3.6×10^6 (pmol/min/mg) で、大腸菌の PPK より若干低い程度であることがわかった⁷⁾。そこで、PPK^T を発現させた大腸菌を用いて、加熱処理によって ATP 再生触媒菌体を構築するという、先に述べた概念の実証を試みた。PPK^T を発現させた大腸菌を 50 mM MOPS 緩衝液 (pH 6.0) に懸濁し、70°C、10 分間の熱処理を行った。得られた熱処理菌体の懸濁液を、ADP、ポリリン酸と混合し、ATP 合成活性を調べた。その結果、熱処理後の菌体は細胞外の基質を利用して ATP を合成できたが、熱処理をしていない菌体には ATP 合成活性は見られなかった (図 3A)。このことから、熱処理によって細胞膜に損傷を与えることで基質である ADP と polyP が細胞膜を透過できることがわかった。さらに、懸濁液上清には ATP 合成活性が確認されなかったことから、PPK^T は細胞外に漏出せず、細胞内で機能していることが明らかになった (図 3B)。電子顕微鏡による熱処理菌体の細胞表面観察では、細胞表面にサブミクロンの孔が生じている様子が確認されている⁹⁾。この孔から PPK^T が漏出しないのは、PPK の分子量が 71kDa と比較的大きい上、4 量体を形成して膜に結合するという性質によるものと考えられる¹⁴⁾。ちなみに筆者らが確認している範囲では分子量が 30 kDa 以下のものになると細胞外に漏出してくるものもあるが、この様なタンパク質については PPK や膜結合タンパク質との融合タンパク質として発現させることで漏出を押さえることが可

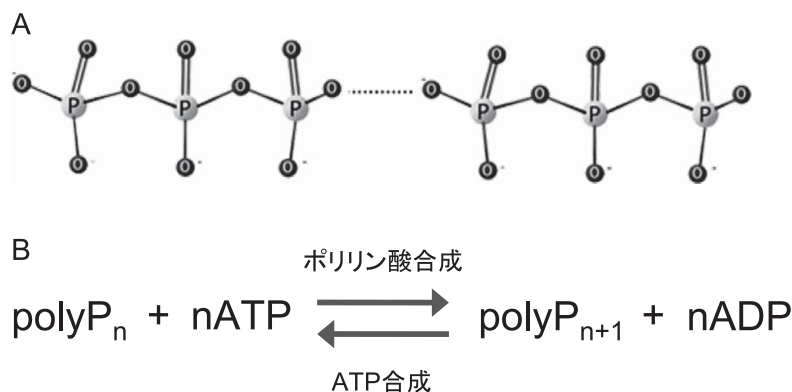


図2. ポリリン酸の構造 (A) とポリリン酸キナーゼによるポリリン酸合成と ATP 合成反応 (B)

能である。また、熱処理後の PPK^T 発現菌体は少なくとも 1 週間にわたって 70% の活性を維持し、非常に安定な反応系であることが明らかになった (図 4)。以上の結果から耐熱性酵素を大腸菌で発現させ、加熱処理後の菌体をそのまま触媒として使うという着想が実証され、同時に非常に安定性が高く、安価な ATP 再生システムを構築することができた。

4. 耐熱性酵素を利用した反応プラットフォームによるものつくりの実際

この様なホールセル生体触媒の構築方法と補酵素 (ATP) 再生システムを、バイオプロセスの反応システムを作る「プラットフォーム」として、実際のものつくりを利用してみた。フルクトース 1,6- ニリン酸 (FDP) は解糖系の中間代謝産物であり、また医薬品の原料としても用いられている。FDP の生合成は解糖系においてはグルコース 6- リン酸から生成されるが、フルクトースキナーゼ (FK) とホスホフルクトキナーゼ (PFK) を用いることでフルクトースから合成できる (図 5)。そこで、*T. thermophilus* HB27 から *pfk* 遺伝子、*fk* 遺伝子を取得し、PPK^T, PFK, FK を発現する大腸菌を作製

した。3 種類の遺伝子をそれぞれ単独に発現する大腸菌を熱処理し、これらを混合して 10 mM フルクトース、30 mM ポリリン酸、1 mM ADP を加え、70°C で反応させたところ、12 時間で 10 mM フルクトースがほぼ 100% FDP に変換された (図 6, 黒丸)。さらに、これら 3 つの酵素を同一菌体内で発現させて反応を行ったところ、100% 変換に要する時間が 4 時間に短縮され、反応速度が 3 倍以上速くなっていることが確認された (図 6, 黒三角)。これは、酵素の高密度化によって酵素同士が近接し、基質あるいは反応中間体の移動距離が短縮されたことによる効果と考えられる。このことから、多段階の反応を行う場合は単一の菌体で反応を行う方が望ましいといえる。

このプラットフォーム技術を用いた FDP 以外の物質生産として、本田らは 2- デオキシリボース 5- リン酸 (DR5P) の合成を報告している⁴⁾。DR5P は核酸合成の前駆物質あるいは医薬品の基本骨格としての需要があり、生細胞内で起こる核酸分解の逆反応を利用することで生合成が可能である¹⁵⁾。本田らは、*T. thermophilus* から FDP aldolase, Triosephosphate isomerase, Deoxyribose aldolase (DERA) を取得し、前述の FDP 合成と組み合わせてフルクトースからの DR5P 合成を行った。この

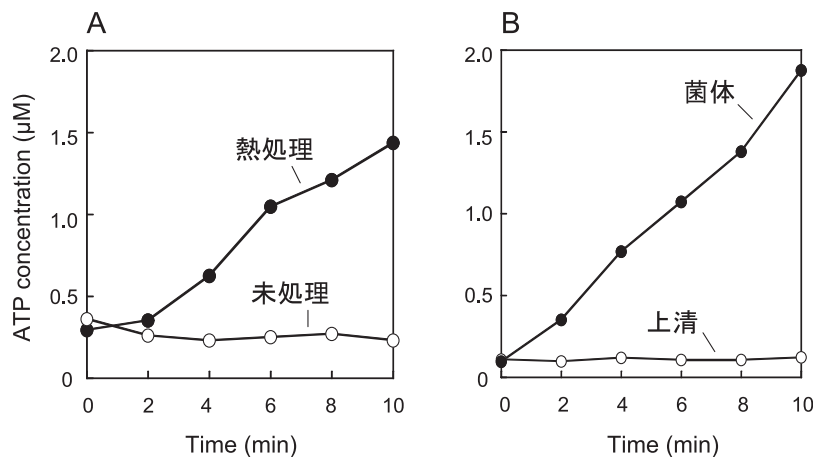


図 3. PPK^T を用いた ATP 再生ホールセル生体触媒の調製 (A) PPK^T 発現大腸菌の ATP 合成活性。(●) 熱処理後菌体, (○) 熱処理をしていない菌体。(B) PPK^T ホールセル生体触媒の菌体 (●) と上清 (○) の ATP 合成活性。

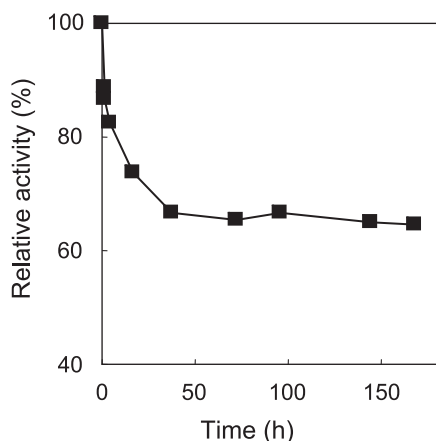


図 4. PPK^T ホールセル生体触媒の安定性

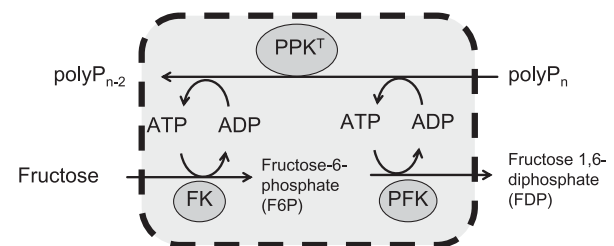


図 5. PPK^T を使った ATP 再生系とフルクトースからのフルクトース 1,6- リン酸合成の共役反応

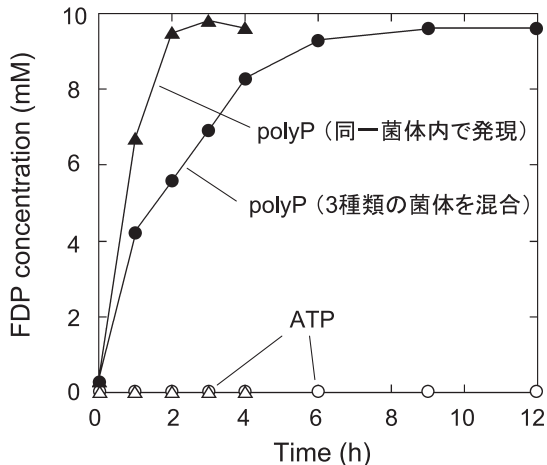


図6. 耐熱性ホールセル生体触媒システムによるフルクトースからのフルクトース 1,6-リン酸合成

反応系においては、反応中間体であるグリセルアルデヒド 3-リン酸やジヒドロキシアセトンリン酸の熱安定性が悪いという問題があったが、FDP 以降の反応を 30°C で行うことにより 10 mM フルクトースから約 55% の収率で DR5P が得られた。これまでに酵母生菌の解糖系と DERA 組換え大腸菌による反応を共役させることで 22% の反応収率が達成されていたが⁹⁾、この結果はそれを大きく上回る。異なる温度での反応などに課題はあるものの、本プラットフォームに生体内反応の逆反応や、マイナーな経路を導入してもものづくりが可能であることを示した好例である。また、同研究グループの Restiawaty らは、*Thermococcus kodakaraensis* KOD1 のグリセロールキナーゼと PPK^T による ATP 再生系との共役反応系において、ポリリン酸を連続的に添加することで 100 mM グリセロールから約 80% の収率でグリセロール 3-リン酸を合成することに成功している¹⁰⁾。さらに、佐藤らは *Thermosynechococcus elongates* BP-1 株から取得した耐熱性 PPK と好熱性細菌 *Thermotoga maritima* 由来の D-アラニル-D-アラニンリガーゼの共役反応によって、80% のモル収率でジペプチド D-alanyl-D-alanine の合成に成功している¹⁷⁾。このように、いくつかの付加価値の高い物質を、実験室レベルではあるが、高収率で合成できることが示されている。

5. ポリリン酸キナーゼ 2 を用いた AMP からの ATP 再生系

ポリリン酸キナーゼ 2 (PPK2) は、*Pseudomonas aeruginosa* において見いだされた PPK1 とは構造的に異なるポリリン酸キナーゼである²¹⁾。*P. aeruginosa* PPK2 の反応は、ポリリン酸依存的 ATP 合成に大きく偏っていることが報告されている (V_{max} ベースで約 1,000 倍)⁶⁾。筆者らは ATP 再生に偏った PPK2 の反応が、より高い ATP 再生効果をもたらすことを期待し、好熱菌から数種類の PPK2 ホモログを取得した。データベース解析から、*T. elongates*, *Meiothermus ruber*, *Meiothermus silvanus*, *Deinococcus radiodurans* に PPK2 ホモログが存在する事を見だし、実際にこれらのホモログが PPK

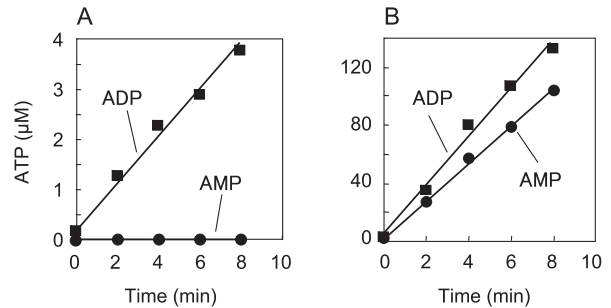


図7. PPK2 による ATP 再生反応。AMP, ADP を基質としたときの PPK^T (A) と *M. ruber* PPK2 (B) の ATP 合成活性

活性を示すことを確認した。しかしながら、残念ながら、いずれの PPK2 も期待したほど ATP 合成活性は高くなく、ポリリン酸合成活性とほとんど変わらないことがわかった。おそらく、*P. aeruginosa* の PPK2 が特殊であるか、あるいは好熱菌の PPK2 にはこのような反応の偏りが無いのかもしれない。ところが、好熱菌の PPK2 にはおもしろい特徴が見いだされた。PPK1 では ADP しか利用することができないのに対し、好熱菌の PPK2 は AMP を基質として ATP を合成できるのである。*M. ruber* PPK2 の AMP → ATP 合成活性は ADP → ATP 合成活性の 70% 程度を示した (図 7)。ATP からピロリン酸を遊離し AMP を生じる生化学反応に、アセチル CoA シンテターゼ (ACS) による酢酸と CoA からのアセチル CoA 合成がある。これまでに ACS によるアセチル CoA の生成反応に ATP を供給する反応として、PPK と polyP-AMP phosphotransferase (PAP) の 2 つの酵素を使った AMP から ATP の再生反応が報告されている⁸⁾。しかし、PPK2 は一段階の反応で AMP から ATP の再生を行うため、反応系を簡略化できる。ATP から AMP を生じる反応は、他にも Acyl-CoA シンテターゼによる脂肪酸と CoA からの Acyl-CoA 合成など多数存在するため、これらの反応における ATP 再生系として利用できる可能性がある。

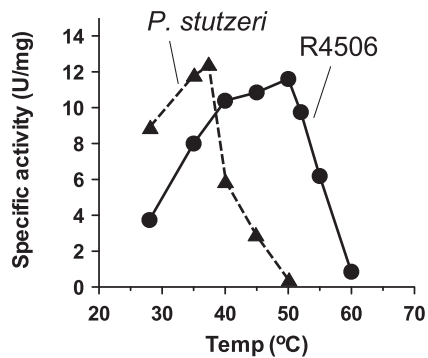
6. 耐熱性亜リン酸デヒドロゲナーゼを使った NADH 再生系

さて、もう一つの主要な補酵素である NADH は、酵素反応における還元力の供給に欠かすことのできない物質である。本プラットフォームにおいて、補酵素利用の制約を無くすためにも NADH 再生系はどうしても必要になる。NADH 再生酵素としては、グルコースデヒドロゲナーゼ (GDH)、アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH)、ギ酸デヒドロゲナーゼ (FDH) などが主に用いられているが¹⁹⁾、我々は 2001 年に報告された *Pseudomonas stutzeri* 由来の亜リン酸デヒドロゲナーゼ (PtxD) を使った NADH 再生系¹⁸⁾ に注目した。PtxD は亜リン酸と NAD⁺ から NADH を生成する酵素であるが (図 8A)、この反応の利点として、①亜リン酸の価格は NADH の 1/1000 未満で非常に安価であること。② NADH の生成と共役させても発エルゴニックに反応が進行し ($\Delta G^\circ = -63.3$ kJ/mol) その反応は不可逆であるこ

A



B



C

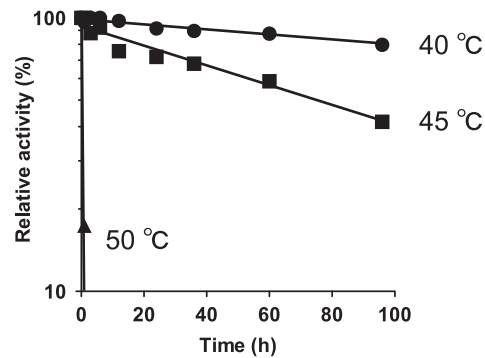


図 8. 耐熱性亜リン酸デヒドロゲナーゼによる NADH 再生系 (A) PtxD による NADH 生成反応 (B) PtxD の反応至適温度 (C) PtxD_{R4506} の熱安定性

と。③反応副産物であるリン酸は緩衝作用を持つため pH 変動による反応阻害が起こらないこと。④有機廃液を出さないクリーンなシステムの構築が可能であることなどが挙げられる。特に、再生反応の基質と生成物がポリリン酸による ATP 再生系と同じようにリン酸ベースの無機物質で統一できることは、廃液の処理においてメリットになる。しかし、既存の PtxD は熱安定性に乏しく不安定であるという問題があった。米国イリノイ大学のグループはランダム変異によって、熱安定性を 60°C 以上に高めた変異体を作製することに成功していたが、熱安定性と引き替えに K_m が上昇し、特異性が低下しているうえに、大腸菌で発現させると Inclusion body になりやすいという問題があった^{12,20}。そこで、我々は独自に熱安定性の高い PtxD の取得を試みた。これまでのアプローチは、常温で生育する *P. stutzeri* の PtxD の変異誘導によって行われていたが、我々は高温で増殖する亜リン酸酸化細菌をスクリーニングし、PtxD の取得を試みた。その結果、45°C で増殖する *Ralstonia* sp. 4506 株から PtxD (PtxD_{R4506}) を取得することに成功した。PtxD_{R4506} の至適温度は 40~50°C であり、50°C 以上では数十分で失活したが、45°C では半減期が 73 時間であり *P. stutzeri* の PtxD に対し、3,000 倍の熱安定性を示した (図 8B, C)。また、酵素の活性も V_{max}/K_m ベースで 6.7 倍以上の値を示し、発現したタンパク質の 90% 以上が可溶性タンパク質として発現していることがわかった (論文投稿中)。しかし、このように従来の PtxD に対して優位なポテンシャルを持っているものの、ホールセル生体触媒として利用するには熱安定性がまだ低く、70°C で熱処理をすると発現したタンパク質の 5% 程度しか残存活性を示さないため、今後もう少し熱安定性を高める必要がある。

7. 100%収率を目指した高度なものづくりへの挑戦と今後の課題

この様に、耐熱性酵素を利用した、バイオプロセスプラットフォームを確立し、実際に物質生産へ応用した例を紹介したが、最後に今後の展望と課題に触れておきたい。原理的に目的の反応を行う耐熱性酵素が存在しさえすれば、このプラットフォーム中に反応を加算的に加えて様々な化合物を合成する生産系を構築できる。よって、多段階の反応を組み合わせた「人工代謝系」を構築し、さらに高度な物質生産へ利用することが期待される。現在筆者らも、解糖系 of 全遺伝子を導入した反応システムの構築を進めている。このような多段階反応を行う場合、前述の FDP 合成の例で明らかになったように、複数の酵素を同一菌体内で発現させた方が反応効率が良い。この効果は、酵素反応のステップが多くなればなるほど顕著になると予想される。従って、複数の遺伝子を同時に発現させる“多重遺伝子発現系”を構築することが望ましい。ただ、一言に多重遺伝子発現と言っても、検討すべき要素は多くあり、発現ベクターの選択、遺伝子の配置やプロモーター、ターミネーターの構造、そしてコドンの適合度などについて考える必要がある。このシステムに最も適した発現形態を選択し、システムティックにそして簡便に構築する技術が必要になる。

また、還元度の高い基質から反応を開始すると、ATP や NADH が生成し ADP, NAD⁺ が不足してしまう場合がある。そこで、このような場合には、これら補酵素の収支を考えてデザインすることが重要である。補酵素の収支を完全に合致させることが困難な場合は、ATP や NADH の再生系ではなく、逆に ADP や NAD⁺ を再生する反応が有効かもしれない。しかし、ATP, NADH を単に消費するのは結局原料のエネルギーを無駄にすることになるので、何らかの形でこれを蓄えることが望ま

れる。ATP に関してはポリリン酸による ATP のエネルギー貯蔵が可能かもしれない。他に、代謝中間体や補酵素の熱安定性なども考慮すべき課題である。これらについてもそれぞれ解決策を見いだし、成熟したシステムへ発展させていきたいと考えている。

8. おわりに

中温菌をホストとして好熱菌のタンパク質を異種発現させ、加熱後に耐熱性酵素のみを機能させるというこのプラットフォームシステムと同じような発想を持った研究者は、おそらくこれまでにないかと思われる。例えば、低温菌をホストに中温菌のタンパク質を使うことや、大腸菌などに好塩菌のタンパク質を発現させ、塩濃度の差で発現タンパク質のみを機能させることも可能かもしれない。しかし、このような方法論でものづくりシステムを構築するということが現実味を帯びてきたのは、DNA データベースや細胞バンクなどにおける遺伝子資源の整備や、これらの加工やタンパク質発現を可能にする遺伝子工学技術の大きな進展が背景にある。これらの素地が整いつつあり、また、生物を要素還元的に捕らえ直す合成生物学研究が広まりを見せている。このような状況下、筆者らの研究を含め関連研究が進展し、バイオ技術利用の起爆剤となることを期待したい。

文 献

- 1) Crans, D.C., R.J. Kazlauskas, B.L. Hirschbein, C.H. Wong, O. Abril, and G.M. Whitesides. 1987. Enzymatic regeneration of adenosine 5'-triphosphate: acetyl phosphate, phosphoenolpyruvate, methoxycarbonyl phosphate, dihydroxyacetone phosphate, 5-phospho-alpha-D-ribose pyrophosphate, uridine-5'-diphosphoglucose. *Methods Enzymol.* 136: 263–280.
- 2) Faber, K. 2004. *Biotransformations in organic chemistry*, 5th ed., Springer-Verlag, New York.
- 3) Hirota, R., A. Kuroda, J. Kato, and H. Ohtake. 2010. Bacterial phosphate metabolism and its application to phosphorus recovery and industrial bioprocesses. *J. Biosci. Bioeng.* 109: 423–432.
- 4) Honda, K., S. Maya, T. Omasa, R. Hirota, A. Kuroda, and H. Ohtake. 2010. Production of 2-deoxyribose 5-phosphate from fructose to demonstrate a potential of artificial bio-synthetic pathway using thermophilic enzymes. *J. Biotechnol.* 148: 204–207.
- 5) Horinouchi, N., J. Ogawa, T. Kawano, T. Sakai, K. Saito, S. Matsumoto, M. Sasaki, Y. Mikami, and S. Shimizu. 2006. Efficient production of 2-deoxyribose 5-phosphate from glucose and acetaldehyde by coupling of the alcoholic fermentation system of Baker's yeast and deoxyriboaldolase-expressing *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70: 1371–1378.
- 6) Ishige, K., H. Zhang, and A. Kornberg. 2002. Polyphosphate kinase (PPK2), a potent, polyphosphate-driven generator of GTP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 16684–16688.
- 7) Iwamoto, S., K. Motomura, Y. Shinoda, M. Urata, J. Kato, N. Takiguchi, H. Ohtake, R. Hirota, and A. Kuroda. 2007. Use of an *Escherichia coli* recombinant producing thermostable polyphosphate kinase as an ATP regenerator to produce fructose 1,6-diphosphate. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 5676–5678.
- 8) Kameda, A., T. Shiba, Y. Kawazoe, Y. Satoh, Y. Ihara, M. Munekata, K. Ishige, and T. Noguchi. 2001. A novel ATP regeneration system using polyphosphate-AMP phosphotransferase and polyphosphate kinase. *J. Biosci. Bioeng.* 91: 557–563.
- 9) Kashihara, H., B.M. Kang, T. Omasa, K. Honda, Y. Sameshima, A. Kuroda, and H. Ohtake. 2010. Electron microscopic analysis of heat-induced leakage of polyphosphate from a *phoU* mutant of *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74: 865–868.
- 10) Kornberg, A. 1995. Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. *J. Bacteriol.* 177: 491–496.
- 11) Kuroda, A., N. Takiguchi, T. Gotanda, K. Nomura, J. Kato, T. Ikeda, and H. Ohtake. 2002. A simple method to release polyphosphate from activated sludge for phosphorus reuse and recycling. *Biotechnol. Bioeng.* 78: 333–338.
- 12) McLachlan, M.J., T.W. Johannes, and H. Zhao. 2008. Further improvement of phosphite dehydrogenase thermostability by saturation mutagenesis. *Biotechnol. Bioeng.* 99: 268–274.
- 13) Noguchi, T. and T. Shiba. 1998. Use of *Escherichia coli* polyphosphate kinase for oligosaccharide synthesis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62: 1594–1596.
- 14) Nomura, K., J. Kato, N. Takiguchi, H. Ohtake, and A. Kuroda. 2004. Effects of inorganic polyphosphate on the proteolytic and DNA-binding activities of Lon in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 279: 34406–34410.
- 15) Ogawa, J., K. Saito, T. Sakai, N. Horinouchi, T. Kawano, S. Matsumoto, M. Sasaki, Y. Mikami, and S. Shimizu. 2003. Microbial production of 2-deoxyribose 5-phosphate from acetaldehyde and triosephosphate for the synthesis of 2'-deoxyribonucleosides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 933–936.
- 16) Restiawaty, E., Y. Iwasa, S. Maya, K. Honda, T. Omasa, R. Hirota, A. Kuroda, and H. Ohtake. 2011. Feasibility of thermophilic adenosine triphosphate-regeneration system using *Thermus thermophilus* polyphosphate kinase. *Process Biochemistry* 46: 1747–1752.
- 17) Sato, M., Y. Masuda, K. Kirimura, and K. Kino. 2007. Thermostable ATP regeneration system using polyphosphate kinase from *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 for D-amino acid dipeptide synthesis. *J. Biosci. Bioeng.* 103: 179–184.
- 18) Vrtis, J.M., A.K. White, W.W. Metcalf, and W.A. van der Donk. 2001. Phosphite dehydrogenase: an unusual phosphoryl transfer reaction. *J. Am. Chem. Soc.* 123: 2672–2673.
- 19) Weckbecker, A., H. Groger, and W. Hummel. 2010. Regeneration of nicotinamide coenzymes: principles and applications for the synthesis of chiral compounds. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 120: 195–242.
- 20) Woodyer, R., W.A. van der Donk, and H. Zhao. 2006. Optimizing a biocatalyst for improved NAD(P)H regeneration: directed evolution of phosphite dehydrogenase. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 9: 237–245.
- 21) Zhang, H., K. Ishige, and A. Kornberg. 2002. A polyphosphate kinase (PPK2) widely conserved in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 16678–16683.
- 22) Zhao, H. and W.A. van der Donk. 2003. Regeneration of cofactors for use in biocatalysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14: 583–589.