(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2020年10月1日(01.10.2020)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2020/196708 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 27/327 (2006.01)　*C12N 9/04* (2006.01)
G01N 27/416 (2006.01)　*G01N 33/15* (2006.01)
H01M 8/16 (2006.01)　*G01N 33/483* (2006.01)
C12N 15/53 (2006.01)　*G01N 33/50* (2006.01)
C12Q 1/32 (2006.01)　*C12N 11/00* (2006.01)

(21) 国際出願番号：　PCT/JP2020/013544

(22) 国際出願日：　2020年3月26日(26.03.2020)

(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 2019-058223　2019年3月26日(26.03.2019)　JP
特願 2019-182592　2019年10月3日(03.10.2019)　JP

(71) 出願人: キッコーマン株式会社(**KIKKOMAN CORPORATION**) [JP/JP]; 〒2788601 千葉県野田市野田２５０番地 Chiba (JP).

(72) 発明者: 鉞　陽介 (**MASAKARI Yosuke**); 〒2788601 千葉県野田市野田２５０番地 キッコーマン株式会社内 Chiba (JP). 豊岡 美穂 (**TOYOOKA Miho**); 〒2788601 千葉県野田市野田２５０番地 キッコーマン株式会社内 Chiba (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人平木国際特許事務所 (**HIRAKI & ASSOCIATES**); 〒1056232 東京都港区愛宕二丁目５－１ 愛宕グリーンヒルズ ＭＯＲＩタワー３２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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：
— 国際調査報告（条約第21条(3)）
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

(54) **Title:** METHOD FOR MODIFYING SUBSTRATE SPECIFICITY OF GLUCOSE DEHYDROGENASE AND AGENT FOR MODIFYING SUBSTRATE SPECIFICITY OF GLUCOSE DEHYDROGENASE

(54) 発明の名称：グルコースデヒドロゲナーゼの基質特異性を改変する方法及びグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤

(57) **Abstract:** The present invention addresses the problem of modifying the substrate specificity of a glucose dehydrogenase. Provided are: a method for modifying the substrate specificity of a glucose dehydrogenase, by using an agent which is for modifying the substrate specificity of the glucose dehydrogenase and is a low molecular weight compound as a glucose analog; and an agent for modifying the substrate specificity of a glucose dehydrogenase.

(57) 要約：グルコースデヒドロゲナーゼの基質特異性を改変することを課題とする。グルコースアナログであり低分子化合物であるグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤を用いる、グルコースデヒドロゲナーゼの基質特異性を改変する方法及びグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤を提供する。

WO 2020/196708 A1

明　細　書

発明の名称 ：

グルコースデヒドロゲナーゼの基質特異性を改変する方法及びグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤

技術分野

[0001] 本開示は、グルコースデヒドロゲナーゼの基質特異性を改変する方法及びグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤に関する。

背景技術

[0002] グルコース測定は、糖尿病患者の血糖値モニタリングなどに用いられる。グルコースの定量には通常、グルコースオキシダーゼ（以下、ＧＯＤともいう）やグルコースデヒドロゲナーゼ（以下、ＧＤＨともいう）が用いられる。

[0003] グルコースオキシダーゼはβ－Ｄ－グルコースをＤ－グルコノ－１，５－ラクトン（グルコノラクトン）へ酸化する反応を触媒する酸化還元酵素である。グルコースオキシダーゼは酸素を電子受容体とし、また補因子としてフラビンアデニンジヌクレオチド（ＦＡＤ）を用いる。

[0004] グルコースデヒドロゲナーゼは酸化還元酵素に分類され、グルコース及び電子アクセプターを基質とし、グルコノラクトン及び還元型アクセプターを生成する反応を触媒する。グルコースデヒドロゲナーゼとしてはニコチンアミドジヌクレオチド依存性ＧＤＨ、ニコチンアミドジヌクレオチドリン酸依存性ＧＤＨ、ピロロキノリンキノン（ＰＱＱ）依存性ＧＤＨ、ＦＡＤ依存性ＧＤＨ（フラビン結合型ＧＤＨ）等が挙げられる。

[0005] グルコースを基質とする酵素を用いて血中グルコースを測定する場合、当該酵素の基質特異性が問題となることがある。特にマルトースに対する反応性が問題となることがあった。例えば野生型ＰＱＱ－ＧＤＨはグルコース特異的ではなく、マルトース、ガラクトース、及びキシロース等の他の糖とも反応する。非特許文献１は、ＰＱＱ－ＧＤＨを用いたグルコース測定におい

て、系に存在するマルトース等に起因して、実際よりも増大したグルコース値が誤って得られ、これが低血糖の原因となる問題について記載している。したがって、酵素を用いたグルコース測定では、グルコースへの特異性が高く、マルトースのような他の糖に対する反応性が低い測定試薬が求められていた。

[0006] グルコースに対する基質特異性を高めるために、或いはマルトースに対する反応性を低減するために、基質特異性の優れたグルコースデヒドロゲナーゼ（GDH）を探索するアプローチが試みられ、種々のFAD依存性GDHが見出された（非特許文献２、３参照）。また、単離されたGDHについて、その遺伝子を取得し、遺伝子工学的に改変して、基質特異性を改変するアプローチも試みられている。

[0007] 一方で、グルコースに対する特異性とは別に、酵素の安定性が問題となることがある。特許文献１（特開２０１５－１３９３７６）は、鉱物であるスメクタイトを添加して、グルコースデヒドロゲナーゼの安定性を高める方法を記載している。

[0008] 特許文献２（国際公開第２００５／０５４８４０号パンフレット）は、ヘマトクリット値を高精度及び高信頼性で測定することにより血液成分量を十分かつ正確に補正可能な血液成分の測定方法およびそれに用いるセンサならびに装置を提供することを目的としており、グルコースデヒドロゲナーゼを含む装置を記載している。段落００２７には、酵素安定化剤として糖アルコールが列挙され、マルチトールが好ましいとされている。また実施例ではマルチトールが用いられている。

[0009] 特許文献３（特開２００５－１１４３５９）は、複雑な補正工程を必要とせず、成分の測定方法及びセンサを提供することを目的としており、血液中のグルコースの測定方法およびそれに用いるセンサを記載している。段落００１６には、酵素安定化剤として糖アルコールが列挙され、マルチトールが好ましいとされている。実施例ではマルチトールが用いられている。

[0010] 特許文献４（国際公開第２００１／０２５７７６号パンフレット）はPQQ-G

DHを用いたグルコースセンサを記載している。第８頁には、バイオセンサの反応層に安定化剤を添加してもよいことの記載があり、安定化剤として糖の開示がある。また糖が列挙されており、グルコース及びマルトースの記載がある。実施例に安定化剤として糖を用いたことの記載は見当たらない。

[0011] 特許文献５（特開２００９－１９５２５０）は、可溶性グルコースデヒドロゲナーゼを含む組成物の安定性を向上する方法を記載しており、アスペルギルス・オリゼ又はアスペルギルス・テレウス由来FAD-GDH組換え体及びトレハロースを含む組成物を記載している。

[0012] 特許文献６（特開２０１４－０１８０９６）は、フラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼを含む組成物の安定性を向上する方法を記載している。

先行技術文献

特許文献

[0013] 特許文献1：特開２０１５－１３９３７６（特許第６４０２８８７号）

特許文献2：国際公開第２００５／０５４８４０号パンフレット

特許文献3：特開２００５－１１４３５９

特許文献4：国際公開第２００１／０２５７７６号パンフレット

特許文献5：特開２００９－１９５２５０（特許第５１７６０４５号）

特許文献6：特開２０１４－０１８０９６（特許第６１０１０１１号）

非特許文献

[0014] 非特許文献1：Frias, et. al., Diabetes Care, Vol. 33, No. 4, April 2010, pp. 728-729

非特許文献2：Tsujimura S, et. al., Biosci Biotechnol Biochem., Vol. 70, 2006, pp. 654-659

非特許文献3：Satake R, et. al., J Biosci Bioeng., Vol. 120, 2015, pp. 498-503

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0015] 本開示は、グルコースアナログである低分子化合物を用いることにより、FAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼの基質特異性を改変する方法、及びグルコースアナログであり低分子化合物であるグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0016] 本発明者らは、上記の問題に鑑み、新規のGDH酵素を探索するアプローチや、既存のGDHに変異を導入してその基質特異性を改変するアプローチとは別の方法により、マルトース等のグルコースではない糖類への反応を改変させる方法について鋭意検討した。その結果、特定のグルコースアナログである低分子化合物が、驚くべきことに、FAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼのグルコースではない糖類（例えばマルトース）への反応性を改変させることを見出し、本発明を完成させた。

[0017] すなわち本開示は以下の実施形態を包含する。

[１] グルコースアナログであり低分子化合物であるグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤を用いることにより、グルコースデヒドロゲナーゼの基質特異性を改変する方法であって、FAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼ（FAD-GDH）を用いてグルコース測定を行うときに、グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤とグルコースデヒドロゲナーゼとを共存させることを含み、該改変剤の不在下での該グルコースデヒドロゲナーゼのマルトースに対する反応性（Mal）とグルコースに対する反応性（Glu）の比（Mal/Glu）と比較して、該改変剤の存在下での該グルコースデヒドロゲナーゼのマルトースに対する反応性（Mal）とグルコースに対する反応性（Glu）の比（Mal/Glu）が改変される、前記方法。

[２] グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤がソルビトール、D-イジトール、L-イジトール、D-グルカール、リビトール、L-グロース、トレハロース、D-マンニトール、キシリトール、及びグリセロールからなる群より選択される１以上の化合物を含む、実施形態１に記載の方法。

[３] グルコースデヒドロゲナーゼがムコール属又はアスペルギルス属由来

のグルコースデヒドロゲナーゼである、実施形態１又は２に記載の方法。

[４] グルコースデヒドロゲナーゼが固相表面に固定化されている、実施形態１～３のいずれかに記載の方法。

[５] グルコースデヒドロゲナーゼが固相表面に固定化されていない、実施形態１～３のいずれかに記載の方法。

[６] グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤であって、該改変剤はグルコースのアナログである低分子化合物であり、該改変剤の不在下でのFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼ（FAD-GDH）のマルトースに対する反応性（Mal）とグルコースに対する反応性（Glu）の比（Mal/Glu）と比較して、該改変剤の存在下での該グルコースデヒドロゲナーゼのマルトースに対する反応性（Mal）とグルコースに対する反応性（Glu）の比（Mal/Glu）が改変される、前記グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤。

[７] グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤がソルビトール、D-イジトール、L-イジトール、D-グルカール、リビトール、L-グロース、トレハロース、D-マンニトール、キシリトール、及びグリセロールからなる群より選択される１以上の化合物を含む、実施形態６に記載の改変剤。

[８] グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤がソルビトール、D-イジトール、L-イジトール、D-グルカール、リビトール、L-グロース、D-マンニトール、及びグリセロールからなる群より選択される１以上の化合物を含む、実施形態６に記載の改変剤。

[９] グルコースデヒドロゲナーゼがムコール属又はアスペルギルス属由来のグルコースデヒドロゲナーゼである、実施形態６～８のいずれかに記載の改変剤。

[１０] 実施形態６～９のいずれかに記載のグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤及び固相表面に固定化されたグルコースデヒドロゲナーゼを含む、グルコース測定用システム。

[１１] 実施形態６～９のいずれかに記載のグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤及び固相表面に固定化されていないグルコースデヒドロゲナ

ーゼを含む、グルコース測定用システム。

[１２] 実施形態６～９のいずれかに記載のグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤及びグルコースデヒドロゲナーゼを含む、グルコース測定用組成物又はグルコース測定試薬。

[１３] グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤と、グルコースデヒドロゲナーゼとを、個別の試薬として含む、実施形態１２に記載のグルコース測定用組成物又はグルコース測定試薬。

[１４] グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤と、グルコースデヒドロゲナーゼとを、同一試薬中に含む、実施形態１２に記載のグルコース測定用組成物又はグルコース測定試薬。

[１５] 実施形態６～９のいずれかに記載の改変剤又は実施形態１０若しくは１１に記載のシステム、又は実施形態１２～１４のいずれかに記載の組成物若しくは試薬を用いた、グルコース測定方法。

[１６] 以下の工程を含む、グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤のスクリーニング方法、

i) グルコースデヒドロゲナーゼを用意する工程、

ii) 該グルコースデヒドロゲナーゼのマルトースに対する反応性（Mal）とグルコースに対する反応性（Glu）の比（Mal/Glu）を決定する工程、

iii) 前記i)のグルコースデヒドロゲナーゼとグルコースのアナログである低分子化合物である候補物質とを接触させ、その後、候補物質の存在下での該グルコースデヒドロゲナーゼのマルトースに対する反応性（Mal）とグルコースに対する反応性（Glu）の比（Mal/Glu）を決定する工程、

iv) 前記ii)における比（Mal/Glu）と、iii)における候補物質の存在下での比（Mal/Glu）とを比較する工程、及び

v) 前記ii)における比（Mal/Glu）よりも、iii)における候補物質の存在下での比（Mal/Glu）が改変されている場合には、当該候補物質を、グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤とする工程。

[１７] 実施形態１６に記載の方法により同定されたグルコースデヒドロゲ

ナーゼ基質特異性改変剤を、グルコース測定試薬又はグルコース測定組成物に配合することを含む、グルコース測定試薬又はグルコース測定組成物の製造方法。

[１８] 実施形態１６に記載の方法により同定されたグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤及びグルコースデヒドロゲナーゼを含む、グルコース測定試薬。

[１９] グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤及びFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼ（FAD-GDH）を含む電極、ここで前記グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤は、ソルビトール、D-イジトール、L-イジトール、D-グルカール、リビトール、L-グロース、トレハロース、D-マンニトール、キシリトール、及びグリセロールからなる群より選択される１以上の化合物を含む、前記電極。

[２０] グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤及びFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼ（FAD-GDH）を含む電池、ここで前記グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤は、ソルビトール、D-イジトール、L-イジトール、D-グルカール、リビトール、L-グロース、トレハロース、D-マンニトール、キシリトール、及びグリセロールからなる群より選択される１以上の化合物を含む、前記電池。

本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2019-058223号及び日本国特許出願番号2019-182592号の開示内容を包含する。

発明の効果

[0018] 本開示により、グルコースデヒドロゲナーゼの基質特異性を改変することができる。

発明を実施するための形態

[0019] ある実施形態において、本開示は、グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤を提供する。本開示の基質特異性改変剤はグルコースのアナログ（類似体）であり得る。本明細書において、グルコースのアナログとは、グルコースと化学構造が類似しているが、グルコースデヒドロゲナーゼにより基

質と認識されない糖化合物又は糖アルコール化合物を言う。グルコースアナログは低分子化合物であり得る。ここで言う低分子化合物とは、分子量（g/mol）が約90～約380の化合物、例えば約150～約380の化合物を言う。また、グルコースデヒドロゲナーゼにより基質と認識されない、とは、グルコースデヒドロゲナーゼにより基質として全く認識されない、又は実質的に基質として認識されないことをいう。実質的に基質として認識されない、とは具体的には、グルコースを基質とした場合の活性（反応性）を100%とすると、グルコースアナログに対する活性が1%以下、0.5%以下、0.1%以下、0.05%以下、0.01%以下、0.005%以下、0.001%以下、例えば0.0005%以下であることをいう。

[0020] ある実施形態において、本開示のグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤は、L-グロース、D-イジトール、L-イジトール、ソルビトール、リビトール（CAS no. 488-81-3、アドニトールともいう）、トレハロース、及びD-グルカール、並びにD-マンニトール、キシリトール、及びグリセロールからなる群より選択される１以上の化合物を含む。別の実施形態において、本開示の基質特異性改変剤は、L-グロース、D-イジトール、L-イジトール、ソルビトール、リビトール、トレハロース、D-グルカール、D-マンニトール、キシリトール、グリセロール又はその１以上の組み合わせである。

[0021] 本開示の基質特異性改変剤が、L-グロース（CAS No. 6027-89-0）を含む場合、これはL体及びD体の混合物、例えばラセミ体として提供されてもよく、又はL体として提供されてもよい。本明細書において、ある光学活性な化合物についてL体とは、例えば光学純度90～100%ee、例えば95～100%ee、例えば97～100%eeにてL体が存在することをいう。例えばL-グロースは、光学純度90～100%ee、例えば95～100%ee、例えば97～100%eeのものであり得る。

[0022] 本開示の基質特異性改変剤がD-イジトール（CAS no. 25878-23-3）を含む場合、これは好ましくはD体として提供される。本明細書において、ある光学活性な化合物についてD体とは、例えば光学純度90～100%ee、例えば95～100%ee、例えば97～100%eeにてD体が存在することをいう。例えばD-イジトールは、光学純度90～100%ee、例えば95～100%ee、例えば97～100%eeのものであり

得る。

[0023] 本開示の基質特異性改変剤がL-イジトール（CAS no. 488-45-9）を含む場合、これは好ましくはL体として提供される。例えばL-イジトールは、光学純度90～100%ee、例えば95～100%ee、例えば97～100%eeのものであり得る。

[0024] 本開示の基質特異性改変剤がD-グルカール（CAS no. 13265-84-4）を含む場合、これは好ましくはD体として提供される。例えばD-グルカールは、光学純度90～100%ee、例えば95～100%ee、例えば97～100%eeのものであり得る。

[0025] 本開示の基質特異性改変剤がD-マンニトール（CAS no. 69-65-8）を含む場合、これは好ましくはD体として提供される。例えばD-マンニトールは、光学純度90～100%ee、例えば95～100%ee、例えば97～100%eeのものであり得る。

[0026] ある実施形態において、本開示のグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤は、スメクタイトを含まない。

[0027] 本開示のグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤は、グルコース測定時における測定溶液中での終濃度が、0.1mM～1000mM、例えば0.1mM～500mM、0.1mM～300mM、0.1mM～100mM、0.1mM～80mM、0.1mM～70mM、0.1mM～60mM、0.1mM～50mM、0.2mM～20mM、0.25mM～10mM、例えば5mMとなるように、グルコース測定試薬又はグルコース測定組成物に配合され得る。ある実施形態において、本開示のグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤及びグルコースデヒドロゲナーゼを含む水溶液を電極に塗布し、乾燥させることができる。この場合、乾燥時にグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤は濃縮され、乾燥前の終濃度よりも高い濃度となることが想定される。このような乾燥後の高濃度での、グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤及び、該改変剤を塗布された電極も本開示に包含される。

[0028] ある実施形態において、本開示は、グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤及びグルコースデヒドロゲナーゼを含む、グルコース測定用組成物又はグルコース測定試薬を提供する。ある実施形態において、グルコース測定試薬は溶液形態又は乾燥形態であり得る。ある実施形態において、グルコース測定試薬中のグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤と、グルコ

ースデヒドロゲナーゼとは、個別の試薬として含まれ得る。別の実施形態では、グルコース測定試薬中のグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤と、グルコースデヒドロゲナーゼとは、同一試薬中に含まれ得る。さらなる実施形態では、グルコース測定試薬はグルコースデヒドロゲナーゼを含まず、この場合、グルコースデヒドロゲナーゼは、グルコース測定時に測定溶液に添加され得る。別の実施形態では、グルコース測定試薬はグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤を含まず、この場合、グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤は、グルコース測定時に測定溶液に添加され得る。

[0029] ある実施形態において本開示は、該基質特異性改変剤及びグルコースデヒドロゲナーゼを用いた、グルコース測定方法を提供する。グルコース測定方法はグルコースの濃度を測定する方法であり得る。グルコース測定方法はグルコースの濃度を定量する方法であり得る。測定される試料は、グルコースを含むものであり得る。測定される試料は、マルトースを含むものであり得る。グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤は、グルコース測定試薬に予め含まれてもよく、又はグルコース測定時に測定溶液に添加されてもよい。

[0030] 本開示のグルコース測定法では、測定時においてグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤が0.1mM～1000mM、例えば0.1mM～500mM、0.1mM～300mM、0.1mM～100mM、0.1mM～80mM、0.1mM～70mM、0.1mM～60mM、0.1mM～50mM、0.2mM～20mM、0.25mM～10mM、例えば5mMの終濃度にて測定溶液に含まれ得る。

[0031] ある実施形態において、本開示のグルコース測定法では、前記のグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤は、グルコース測定溶液に含まれていてもよい。この場合、当該グルコース測定溶液に、グルコースデヒドロゲナーゼ及び試料を添加して、測定を開始してもよい。或いは、グルコースデヒドロゲナーゼを電極に固定化し、当該グルコース測定溶液及び試料を電極に接触させ、グルコース測定を行ってもよい。

[0032] 別の実施形態では、本開示のグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤は、予めグルコース測定試薬に含まれていてもよい。この測定試薬はグル

コースデヒドロゲナーゼを含むものであってもよく、又は含まないものであり得る。測定試薬がグルコースデヒドロゲナーゼを含む場合、そこに試料を添加してグルコース測定を開始しうる。測定試薬がグルコースデヒドロゲナーゼを含まない場合、そこに試料及びグルコースデヒドロゲナーゼを（任意の順で）添加してグルコース測定を開始しうる。或いは、グルコースデヒドロゲナーゼを電極に固定化し、当該測定試薬及び試料を電極に接触させ、グルコース測定を行ってもよい。

[0033] 本明細書では、特に断らない限り、グルコースデヒドロゲナーゼとは、FAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼ（FAD-GDH）をいう。グルコースデヒドロゲナーゼとして、公知のFAD-GDHを用いることができる。公知のFAD-GDHの由来微生物の好適な例としては、ケカビ亜門、好ましくはケカビ綱、より好ましくはケカビ目、さらに好ましくはケカビ科に分類される微生物を挙げることができる。具体的には、ムコール(Mucor)属、アブシジア(Absidia)属、アクチノムコール(Actinomucor)属、シルシネラ(Circinella)属由来のFAD-GDH等が挙げられる。

[0034] Mucor属に分類される微生物であって、具体的な好ましい微生物の例としては、Mucor prainii、Mucor javanicus、Mucor circinelloides f. circinelloides、Mucor guilliermondii、Mucor hiemalis f. silvaticus、Mucor subtilissimus、Mucor dimorphosporus等が挙げられる。より具体的には、Mucor prainii、Mucor javanicus、Mucor circinelloides f. circinelloides、Mucor guilliermondii NBRC9403、Mucor hiemalis、Mucor hiemalis f. silvaticus NBRC6754、Mucor subtilissimus NBRC6338、Mucor RD056860、Mucor dimorphosporus NBRC5395等が挙げられる。Absidia属に分類される微生物であって、具体的な好ましい微生物の例としては、Absidia cylindrospora、Absidia hyalosporaを挙げることができる。Actinomucor属に分類される微生物であって、具体的な好ましい微生物の例としては、Actinomucor elegansを挙げることができる。Circinella属に分類される微生物であって、具体的な好ましい微生物の例としては、Circinella minor、Circinella mucoroides、Circin

ella muscae、Circinella rigida、Circinella simplex、Circinella umbellataを挙げることができる。より具体的には、Circinella minor NBRC6448、Circinella mucoroides NBRC4453、Circinella muscae NBRC6410、Circinella rigida NBRC6411、Circinella simplex NBRC6412、Circinella umbellata NBRC4452、Circinella umbellata NBRC5842、Circinella RD055423及びCircinella RD055422を挙げることができる。なお、NBRC菌株およびRD菌株はNBRC（独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター）の保管菌株である。これらのFAD-GDHには、その変異体も包含される。

[0035] 他の公知のFAD-GDHとしてはアスペルギルス属由来のFAD-GDH、例えばアスペルギルス・オリゼ由来GDH、アスペルギルス・アワモリ由来GDH、アスペルギルス・アウレウス由来GDH、アスペルギルス・ニガー由来GDH、アスペルギルス・フォエチダス由来GDH、アスペルギルス・イイズカエ由来GDH、アスペルギルス・バージカラー由来GDH、アスペルギルス・ホエニクス由来GDH、アスペルギルス・ビスポラス由来GDH、Aspergillus brunneo-uniseriatus由来GDH、Aspergillus carneus由来GDH、Aspergillus malignus由来GDH及びアスペルギルス・テレウス由来GDHが挙げられる。これらのFAD-GDHには、その変異体も包含される。

[0036] 他の公知のFAD-GDHとしてはグロメラ属由来のFAD-GDH、例えばGlomerella fructigena由来GDH、例えばGlomerella fructigena NBRC5951株由来GDH、Glomerella cingulata由来GDH、例えばGlomerella cingulata NBRC107000株由来GDH、コレトトリカム属由来のFAD-GDH、例えばColletotrichum gloeosporioides由来GDH、Colletotrichum chlorophyti由来GDH、Colletotrichum orbiculare由来GDH、ボトリオスフェリア属由来のFAD-GDH、例えばBotryosphaeria parva由来GDHが挙げられる。また、ブルクホルデリア属由来のFAD-GDH、例えば膜タンパク質であるBurkhorderia cepacia由来GDH、Burkhorderia cepacia KS1株由来GDHが挙げられる。例えば特開2019-000020(特許第6453385号)、国際公開第2017/002896号、国際公開第2002/036779号(特許第4107386号)等を参照のこと。これらのFAD-GDHには、その変異体も包含される。

[0037] （FAD-GDHをコードする遺伝子の取得）

FAD-GDHをコードする遺伝子は、遺伝子工学的手法により取得することができる。FAD-GDH遺伝子を取得するには、通常一般的に用いられている遺伝子のクローニング方法を用いればよい。例えばFAD-GDH生産能を有する公知の微生物菌体や種々の細胞から、常法により、例えば、Current Protocols in Molecular Biology (WILEY Interscience,1989)記載の方法により、染色体DNA又はmRNAを抽出することができる。さらにmRNAを鋳型としてcDNAを合成することができる。このようにして得られた染色体DNA又はcDNAを用いて、染色体DNA又はcDNAのライブラリーを作製することができる。

[0038] ついで、公知のFAD-GDHのアミノ酸配列情報に基づき、適当なプローブDNAを合成して、これを用いて染色体DNA又はcDNAのライブラリーから基質特異性の高いFAD-GDH遺伝子を選抜する方法、あるいは、上記アミノ酸配列に基づき、適当なプライマーDNAを作製して、5’RACE法や3’RACE法などの適当なポリメラーゼ連鎖反応（PCR法）により、基質特異性の高いFAD-GDHをコードする目的の遺伝子断片を含むDNAを増幅させ、これらのDNA断片を連結させて、目的のFAD-GDH遺伝子の全長を含むDNAを得ることができる。

[0039] 取得されたFAD-GDH遺伝子に変異を導入し、各種の変異遺伝子から発現されるFAD-GDHの酵素科学的性質を指標に選択を行う方法を採用し得る。

[0040] 出発物質であるFAD-GDH遺伝子の変異処理は、企図する変異形態に応じた、公知の任意の方法で行うことができる。すなわち、FAD-GDH遺伝子あるいは当該遺伝子の組み込まれた組換え体DNAと変異原となる薬剤とを接触・作用させる方法；紫外線照射法；遺伝子工学的手法；又は蛋白質工学的手法を駆使する方法等を広く用いることができる。

[0041] 上記変異処理に用いられる変異原となる薬剤としては、例えば、ヒドロキシルアミン、N-メチル-N’-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、亜硝酸、亜硫酸、ヒドラジン、蟻酸、若しくは5-ブロモウラシル等を挙げることができる。

[0042] この接触・作用の諸条件は、用いる薬剤の種類等に応じた条件を採ることが可能であり、現実に所望の変異をFAD-GDH遺伝子において惹起することがで

きる限り特に限定されない。通常、好ましくは0.5～12Mの上記薬剤濃度において、20～80℃の反応温度下で10分間以上、好ましくは10～180分間接触・作用させることで、所望の変異を惹起可能である。紫外線照射を行う場合においても、上記の通り常法に従い行うことができる（現代化学、p24～30、1989年6月号）。

[0043] 蛋白質工学的手法を駆使する方法としては、一般的に、Site-Specific Mutagenesisとして知られる手法を用いることができる。例えば、Kramer法（Nucleic Acids Res.,12,9441(1984):Methods Enzymol.,154,350(1987):Gene,37,73(1985))、Eckstein法(Nucleic Acids Res.,13,8749(1985):Nucleic Acids Res.,13,8765(1985):Nucleic Acids Res,14,9679(1986))、Kunkel法(Proc. Natl. Acid. Sci. U.S.A.,82,488(1985)：Methods Enzymol.,154,367(1987))等が挙げられる。DNA中の塩基配列を変換する具体的な方法としては、例えば市販のキット(Transformer Mutagenesis Kit;Clonetech社、EXOIII/Mung Bean Deletion Kit;Stratagene製、Quick Change Site Directed Mutagenesis Kit;Stratagene製など）の利用が挙げられる。

[0044] また、一般的なポリメラーゼチェインリアクション(Polymerase Chain Reaction)として知られる手法を用いることもできる(Technique,1,11(1989))。なお、上記遺伝子改変法の他に、有機合成法又は酵素合成法により、直接所望のFAD-GDH遺伝子を合成することもできる。

[0045] 上記のような任意の方法により選択されたFAD-GDH遺伝子のDNA塩基配列の決定又は確認を行う場合には、例えば、マルチキャピラリーDNA解析システムCEQ2000（ベックマン・コールター社製）等を用いれば良い。

[0046] （FAD-GDH遺伝子が挿入されたベクターおよび宿主細胞）

上述のように得られたFAD-GDH遺伝子を、常法により、バクテリオファージ、コスミド、又は原核細胞若しくは真核細胞の形質転換に用いられるプラスミド等のベクターに組み込み、各々のベクターに対応する宿主細胞を常法により、形質転換又は形質導入をすることができる。

[0047] 原核宿主細胞の一例としては、エシェリヒア属に属する微生物、例えば大

腸菌K-12株、エシェリヒア・コリーBL21(DE3)、エシェリヒア・コリーJM109、エシェリヒア・コリーDH5α、エシェリヒア・コリーW3110、エシェリヒア・コリーC600等（いずれもタカラバイオ社製）が挙げられる。それらを形質転換し、又は、それらに形質導入して、DNAが導入された宿主細胞（形質転換体）を得る。こうした宿主細胞に組み換えベクターを移入する方法としては、例えば宿主細胞がエシェリヒア・コリーに属する微生物の場合には、カルシウムイオンの存在下で組み換えDNAの移入を行う方法などを採用することができる、更にエレクトロポレーション法を用いても良い。更には市販のコンピテントセル（例えばECOS Competent エシェリヒア・コリーBL21(DE3)；ニッポンジーン製）を用いても良い。

[0048] 真核宿主細胞の一例としては、酵母が挙げられる。酵母に分類される微生物としては、例えば、チゴサッカロマイセス(Zygosaccharomyces)属、サッカロマイセス(Saccharomyces)属、ピキア(Pichia)属、カンジダ(Candida)属などに属する酵母が挙げられる。挿入遺伝子には、形質転換された細胞を選択することを可能にするためのマーカー遺伝子が含まれていてもよい。マーカー遺伝子としては、例えば、URA3、TRP1のような、宿主の栄養要求性を相補する遺伝子等が挙げられる。また、挿入遺伝子は、宿主細胞中で目的遺伝子を発現することのできるプロモーター又はその他の制御配列（例えば、エンハンサー配列、ターミネーター配列、ポリアデニル化配列等）を含むことが望ましい。プロモーターとしては、具体的には、例えば、GAL1プロモーター、ADH1プロモーター等が挙げられる。酵母への形質転換方法としては、公知の方法、例えば、酢酸リチウムを用いる方法(MethodsMol. Cell. Biol., 5, 255-269(1995))やエレクトロポレーション(J Microbiol Methods 55 (2003)481-484)等を好適に用いることができるが、これに限定されず、スフェロプラスト法やガラスビーズ法等を含む各種任意の手法を用いて形質転換を行えばよい。

[0049] また、例えば、真核宿主細胞の他の例としては、アスペルギルス(Aspergillus)属やトリコデルマ(Tricoderma)属のようなカビ細胞が挙げられる。カビ

細胞の形質転換体の作製方法は特に限定されず、例えば、常法に従って、FAD-GDHをコードする遺伝子が発現する態様で宿主糸状菌に挿入する方法が挙げられる。具体的には、FAD-GDHをコードする遺伝子を発現誘導プロモーター及びターミネーターの間に挿入したDNAコンストラクトを作製し、次いでFAD-GDHをコードする遺伝子を含むDNAコンストラクトで宿主糸状菌を形質転換することにより、FAD-GDHをコードする遺伝子を過剰発現する形質転換体が得られる。本明細書では、宿主糸状菌を形質転換するために作製された、発現誘導プロモーター－FAD-GDHをコードする遺伝子－ターミネーターからなるDNA断片及び該DNA断片を含む組換えベクターをDNAコンストラクトと総称してよぶ。

[0050] FAD-GDHをコードする遺伝子が発現する態様で宿主糸状菌に挿入する方法は特に限定されないが、例えば、相同組換えを利用することにより宿主生物の染色体上に直接的に挿入する手法；プラスミドベクター上に連結することにより宿主糸状菌内に導入する手法などが挙げられる。

[0051] 相同組換えを利用する方法では、染色体上の組換え部位の上流領域及び下流領域と相同な配列の間に、DNAコンストラクトを連結し、宿主糸状菌のゲノム中に挿入することができる。自身の高発現プロモーター制御下で宿主糸状菌内で過剰発現することにより、セルフクローニングによる形質転換体を得ることができる。高発現プロモーターは特に限定されないが、例えば、翻訳伸長因子であるTEF1遺伝子(tef1)のプロモーター領域、α－アミラーゼ遺伝子(amy)のプロモーター領域、アルカリプロテアーゼ遺伝子(alp)プロモーター領域などが挙げられる。

[0052] ベクターを利用する方法では、DNAコンストラクトを、常法により、糸状菌の形質転換に用いられるプラスミドベクターに組み込み、対応する宿主糸状菌を常法により形質転換することができる。

[0053] そのような、好適なベクター－宿主系としては、宿主糸状菌中でFAD-GDHを生産させ得る系であれば特に限定されず、例えば、pUC19及び糸状菌の系、pSTA14（Mol. Gen. Genet. 218, 99-104, 1989）及び糸状菌の系などが挙げら

れる。

[0054] DNAコンストラクトは宿主糸状菌の染色体に導入して用いることが好ましいが、この他の方法として、自律複製型のベクター（Ozeki et al. Biosci. Biotechnol. Biochem. 59, 1133 (1995)）にDNAコンストラクトを組み込むことにより、染色体に導入しない形で用いることもできる。

[0055] DNAコンストラクトには、形質転換された細胞を選択することを可能にするためのマーカー遺伝子が含まれていてもよい。マーカー遺伝子は特に限定されず、例えば、pyrG、niaD、adeAのような、宿主の栄養要求性を相補する遺伝子；ピリチアミン、ハイグロマイシンＢオリゴマイシンなどの薬剤に対する薬剤耐性遺伝子などが挙げられる。また、DNAコンストラクトは、宿主細胞中でFAD-GDHをコードする遺伝子を過剰発現することを可能にするプロモーター、ターミネーターその他の制御配列（例えば、エンハンサー、ポリアデニル化配列など）を含むことが好ましい。プロモーターは特に限定されないが、適当な発現誘導プロモーターや構成的プロモーターが挙げられ、例えば、tef1プロモーター、alpプロモーター、amyプロモーターなどが挙げられる。ターミネーターもまた特に限定されないが、例えば、alpターミネーター、amyターミネーター、tef1ターミネーターなどが挙げられる。

[0056] DNAコンストラクトにおいて、FAD-GDHをコードする遺伝子の発現制御配列は、挿入するFAD-GDHをコードする遺伝子を含むDNA断片が、発現制御機能を有している配列を含む場合は必ずしも必要ではない。また、共形質転換法により形質転換を行う場合には、DNAコンストラクトはマーカー遺伝子を有しなくてもよい場合がある。

[0057] DNAコンストラクトの一実施態様は、例えば、pUC19のマルチクローニングサイトにあるIn-Fusion Cloning Siteに、tef1遺伝子プロモーター、FAD-GDHをコードする遺伝子、alp遺伝子ターミネーター及びpyrGマーカー遺伝子を連結させたDNAコンストラクトである。

[0058] 糸状菌への形質転換方法としては、当業者に知られる方法を適宜選択することができ、例えば、宿主糸状菌のプロトプラストを調製した後に、ポリエ

チレングリコール及び塩化カルシウムを用いるプロトプラストPEG法（例えば、Mol. Gen. Genet. 218, 99-104, 1989、特開2007-222055号公報などを参照）を用いることができる。形質転換糸状菌を再生させるための培地は、用いる宿主糸状菌と形質転換マーカー遺伝子とに応じて適切なものを用いる。例えば、宿主糸状菌としてアスペルギルス・ソーヤを用い、形質転換マーカー遺伝子としてpyrG遺伝子を用いた場合は、形質転換糸状菌の再生は、例えば、0.5%寒天及び1.2Mソルビトールを含むCzapek-Dox最少培地（ディフコ社）で行うことができる。

[0059] また、例えば、形質転換糸状菌を得るために、相同組換えを利用して、宿主糸状菌が本来染色体上に有するFAD-GDHをコードする遺伝子のプロモーターをtef1などの高発現プロモーターへ置換してもよい。この際も、高発現プロモーターに加えて、pyrGなどの形質転換マーカー遺伝子を挿入することが好ましい。例えば、この目的のために、特開2011-239681に記載の実施例１や図１を参照して、FAD-GDHをコードする遺伝子の上流領域－形質転換マーカー遺伝子－高発現プロモーター－FAD-GDHをコードする遺伝子の全部又は部分からなる形質転換用カセットなどが利用できる。この場合、FAD-GDHをコードする遺伝子の上流領域及びFAD-GDHをコードする遺伝子の全部又は部分が相同組換えのために利用される。FAD-GDHをコードする遺伝子の全部又は部分は、開始コドンから途中の領域を含むものが使用できる。相同組換えに適した領域の長さは0.5kb以上あることが好ましい。

[0060] 形質転換糸状菌が作製されたことの確認は、FAD-GDHの酵素活性が認められる条件下で形質転換糸状菌を培養し、次いで培養後に得られた培養物におけるFAD-GDHの活性を確認することにより行うことができる。

[0061] また、形質転換糸状菌が作製されたことの確認は、形質転換糸状菌から染色体DNAを抽出し、これを鋳型としてPCRを行い、形質転換が起きた場合に増幅が可能なＰＣＲ産物が生じることを確認することにより行ってもよい。

[0062] 例えば、用いたプロモーターの塩基配列に対するフォワードプライマーと、形質転換マーカー遺伝子の塩基配列に対するリバースプライマーとの組み

合わせでＰＣＲを行い、想定の長さの産物が生じることを確認する。

[0063] （FAD-GDH酵素の製造方法）

FAD-GDH酵素は、上述のように取得したFAD-GDHを生産する宿主細胞を培養し、前記宿主細胞中に含まれるFAD-GDH遺伝子を発現させ、次いで、前記培養物からFAD-GDHを単離することにより製造すればよい。

[0064] 上記宿主細胞を培養する培地としては、例えば、酵母エキス、トリプトン、ペプトン、肉エキス、コーンスティープリカーあるいは大豆若しくは小麦ふすまの浸出液等の１種以上の窒素源に、塩化ナトリウム、リン酸第１カリウム、リン酸第２カリウム、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、塩化第２鉄、硫酸第２鉄あるいは硫酸マンガン等の無機塩類の１種以上を添加し、さらに必要により糖質原料、ビタミン等を適宜添加したものが用いられる。

[0065] 培地の初発pHは、限定されないが、例えば、pH 6～9に調整することができる。培養は、10～42℃の培養温度、好ましくは25℃前後の培養温度で4時間～1週間、さらに好ましくは25℃前後の培養温度で4時間～5日間、通気攪拌深部培養、振盪培養、静置培養等により実施すればよい。

[0066] 培養終了後、該培養物よりFAD-GDH酵素を採取する。これには、通常の公知の酵素採取手段を用いればよい。例えば、常法により菌体を、超音波破壊処理、磨砕処理等するか、もしくはリゾチームやヤタラーゼ等の溶菌酵素を用いて本酵素を抽出するか、又はトルエン等の存在下で振盪若しくは放置して溶菌を行わせ、本酵素を菌体外に排出させることができる。そして、この溶液を濾過、遠心分離等して固形部分を除去し、必要によりストレプトマイシン硫酸塩、プロタミン硫酸塩、若しくは硫酸マンガン等により核酸を除去したのち、これに硫安、アルコール、アセトン等を添加して分画し、沈澱物を採取し、FAD-GDHの粗酵素を得る。

[0067] FAD-GDHの粗酵素を、公知の任意の手段を用いてさらに精製することもできる。精製された酵素標品を得るには、例えば、セファデックス、ウルトロゲル若しくはバイオゲル等を用いるゲル濾過法；イオン交換体を用いる吸着溶出法；ポリアクリルアミドゲル等を用いる電気泳動法；ヒドロキシアパタイ

トを用いる吸着溶出法；蔗糖密度勾配遠心法等の沈降法；アフィニティクロマトグラフィー法；分子ふるい膜若しくは中空糸膜等を用いる分画法等を適宜選択し、又はこれらを組み合わせて実施することにより、精製されたFAD-GDH酵素標品を得ることができる。

[0068] ある実施形態において、グルコースデヒドロゲナーゼは、固相に固定化されていてもよい。ある実施形態において本開示は、前記の基質特異性改変剤、及び、グルコースデヒドロゲナーゼが固定化された固相を含む、グルコース測定キット又はグルコース測定システム（装置）を提供する。固相としては、ビーズや粒子、ポリマー、電極表面などが挙げられるがこれに限らない。例えば、ある実施形態において、グルコースデヒドロゲナーゼは、電極に固定化されていてもよい。ある実施形態において本開示は、前記の基質特異性改変剤、及び、グルコースデヒドロゲナーゼが固定化された電極を含む、グルコース測定システム（装置）を提供する。

[0069]（グルコースデヒドロゲナーゼの固定化方法）

グルコースデヒドロゲナーゼは任意の公知の方法により固相に固定化されうる。グルコースデヒドロゲナーゼをビーズや膜、炭素粒子、金粒子、白金粒子、ポリマー、電極表面に固定化してもよい。固定化方法としては、架橋試薬を用いる方法、高分子マトリックス中に封入する方法、透析膜で被覆する方法、光架橋性ポリマー、導電性ポリマー、酸化還元ポリマーなどがあり、グルコースデヒドロゲナーゼをポリマー中に固定あるいは電極上に吸着固定してもよく、またこれらを組み合わせて用いてもよい。典型的には、グルタルアルデヒドを用いてグルコースデヒドロゲナーゼをカーボン電極上に固定化した後、アミン基を有する試薬で処理してグルタルアルデヒドをブロッキングする。ある実施形態では、グルコースデヒドロゲナーゼを固相表面に固定化する際に、本開示のグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤を存在させてもよい。

[0070] ある実施形態では、グルコースデヒドロゲナーゼを電極に固定化して用いる場合、又はグルコースデヒドロゲナーゼを固定化することなく用いる場合

、メディエータとして、公知のメディエータ、例えば1-メトキシ-5-メチルフェナジニウムメチルスルファート（mPMS）、5-メチルフェナジニウムメチルスルファート（PMS）、5-エチルフェナジニウムメチルスルファート（PES）等のフェナジン系化合物、フェノチアジン系化合物、フェリシアン化カリウム等のフェリシアン化物、フェロセン、ジメチルフェロセン、フェロセンカルボン酸等のフェロセン系化合物、ナフトキノン、アントラキノン、ヒドロキノン、ピロロキノリンキノン等のキノン系化合物、シトクロム系化合物、ベンジルビオロゲンやメチルビオロゲン等のビオロゲン系化合物、ジクロロフェノールインドフェノール等のインドフェノール系化合物、塩化ヘキサアンミンルテニウム等のルテニウム錯体、オスミウム-2,2’-ビピリジン等のオスミウム錯体、p-フェニレンジアミン、N-イソプロピル-N’-フェニル-p-フェニレンジアミン(IPPD)、N’,N-ジフェニル-ｐ-フェニレンジアミン(DPPD)、N-(1,3-ジメチルブチル)-N’-フェニル-p-フェニレンジアミン、N,N,N’,N’－テトラメチル－1,4－フェニレンジアミン等のフェニレンジアミン系化合物を用いることができる。また、これらのメディエータはポリビニルイミダゾール、ポリエチレンイミン、ポリアクリル酸などのポリマーに修飾されて用いることもできる。また、これらのメディエータはGDHに架橋試薬等を用いて固定化することもできる。また、これらのメディエータは特許第6484741号及び特許6484742号を参照にして、疎水性相互作用により電極に固定化することもできる。参照によりこれらの全内容を本明細書に組み入れる。また、これらのメディエータは電極表面を酸処理等して活性化させた後に、電極に固定化することもできる。電極は炭素、金、白金等の素材等を用いることが出来る。

[0071] 試料溶液に添加するメディエータの終濃度は特に限定されず、例えば、1pM～1M、1pM～100mM、1pM～20mM、1pM～10mM、1pM～5mM、2pM～1mM、3pM～800μM、4pM～600μM、5pM～500μM、6pM～400μM、7pM～300μM、8pM～200μM、9pM～100μM、10pM～50μMの範囲であり得る。なお、メディエータと他の試薬との添加順序は制限されず、同時でも逐次添加でもよい。

[0072] ある実施形態において酸化還元反応を行う時間又は電気化学的測定を行う時間は、60分以下、30分以下、10分以下、5分以下、又は1分以下とすることができる。または、長期間測定する酵素センサーや電池等においては、酸化還元反応を行う時間は、60分以上、120分以上、1日以上、2日以上、3日以上、1週間以上、2週間以上、3週間以上とすることができる。

[0073] 特に断らない限り、組成物に含まれるグルコースデヒドロゲナーゼ或いは電極に固定化されたグルコースデヒドロゲナーゼは、精製されたグルコースデヒドロゲナーゼ酵素である。

[0074] （グルコースデヒドロゲナーゼの活性測定）

グルコースデヒドロゲナーゼ（GDH）の活性測定を説明する。GDH(EC 1.1.99.10)は、グルコースの水酸基を酸化してグルコノ－δ－ラクトンを生成する反応を触媒する。このとき電子受容体が電子を受け取り、還元型電子受容体になる。GDHの活性は、この作用原理を利用し、例えば、電子受容体としてフェナジンメトサルフェート(PMS)及び2,6-ジクロロインドフェノール(DCIP)を用いた以下の測定系を用いて測定することができる。

（反応１） D-グルコース ＋ PMS（酸化型）

→ D-グルコノ-δ-ラクトン ＋ PMS（還元型）

（反応２） PMS（還元型） ＋ DCIP（酸化型）

→ PMS（酸化型） ＋ DCIP（還元型）

[0075] 具体的には、まず、（反応１）において、D-グルコースの酸化に伴い、PMS（還元型）が生成する。続いて進行する（反応２）により、PMS（還元型）が酸化されるのに伴ってDCIPが還元される。この「DCIP（酸化型）」の消失度合を波長600nmにおける吸光度の変化量として検知し、この変化量に基づいて酵素活性を求めることができる。

[0076] GDHの活性は、以下の手順に従って測定することができる。100mM リン酸緩衝液(pH7.0) 2.05mL、1M D-グルコース溶液 0.6mLおよび2mM DCIP溶液 0.15mLを混合し、37℃で5分間保温する。次いで、15mM PMS溶液 0.1mL及び酵素サンプル溶液0.1mLを添加し、反応を開始する。反応開始時、および、経時的な

吸光度を測定し、酵素反応の進行に伴う600nmにおける吸光度の１分間あたりの減少量(ΔA600)を求め、次式に従いGDH活性を算出する。この際、GDH活性は、37℃において濃度200mMのD-グルコース存在下で１分間に1μmolのDCIPを還元する酵素量を１Ｕと定義する。

[0077] [数1]

$$\text{GDH 活性 (U/mL)} = \frac{-\left(\Delta A600 - \Delta A600_{\text{blank}}\right) \times 3.0 \times dF}{16.3 \times 0.1 \times 1.0}$$

[0078] なお、式中の3.0は反応試薬＋酵素試薬の液量(mL)、16.3は本活性測定条件におけるミリモル分子吸光係数($cm^2/\mu mol$)、0.1は酵素溶液の液量(mL)、1.0はセルの光路長(cm)、$\Delta A600_{blank}$は100mM リン酸緩衝液(pH7.0)を酵素サンプル溶液の代わりに添加して反応開始した場合の600nmにおける吸光度の１分間あたりの減少量、dfは希釈倍数を表す。

[0079] 本開示のグルコース測定用キットは、少なくとも１回のアッセイに十分な量の基質特異性改変剤を含む。典型的には、本開示のグルコース測定用キットは、基質特異性改変剤に加えて、グルコースデヒドロゲナーゼ、アッセイに必要な緩衝液、キャリブレーションカーブ作製のためのグルコース基質標準溶液、ならびに指針を含む。基質標準溶液はグルコース標準溶液であり得る。なお、グルコースデヒドロゲナーゼのマルトースに対する反応性を評価する場合には、濃度既知のマルトース基質標準溶液を用いることもできる。

[0080] ある実施形態において、本開示のグルコース測定用キットは、基質特異性改変剤とグルコースデヒドロゲナーゼとを同一試薬として含む。別の実施形態において、本開示のグルコース測定用キットは、基質特異性改変剤とグルコースデヒドロゲナーゼとを別々の試薬として含む。別の実施形態では、グルコースデヒドロゲナーゼは電極に固定化されていてもよく、そのような電極に対して用いる本開示のグルコース測定用キットは基質特異性改変剤を単一試薬として含む。ただしここでいう単一試薬とは、当該試薬が基質特異性改変剤以外の物質を含まないことを意味するものではない。基質特異性改変剤は溶液状態でも乾燥状態、例えば粉末でもよい。

[0081] 比色法を用いた一例としてグルコース濃度の測定が挙げられる。グルコース濃度の測定は、比色式測定用の場合は、例えば、以下のように行うことができる。反応層にはグルコースデヒドロゲナーゼ(GDH)、そして反応促進剤としてN-(2-アセトアミド）イミド２酢酸(ADA)、ビス(2-ヒドロキシエチル）イミノトリス（ヒドロキシメチル）メタン(Bis-Tris)、炭酸ナトリウムおよびイミダゾールからなる群より選ばれる１以上の物質を含む液状もしくは固体状の組成物を保持させておく。ここで、必要に応じてpH緩衝剤、発色試薬（変色試薬）を添加する。ここにグルコースを含む試料を加え、一定時間反応させる。この間、GDHより電子を直接受け取ることによって重合し生成する色素もしくは還元された色素の最大吸収波長に相当する吸光度をモニタリングする。レート法であれば、吸光度の時間あたりの変化率から、エンドポイント法であれば、試料中のグルコースがすべて酸化された時点までの吸光度変化から、予め標準濃度のグルコース溶液を用いて作製したキャリブレーションカーブを元にして、試料中のグルコース濃度を算出することができる。

[0082] この方法において使用できる発色試薬（変色試薬）としては、例えば2,6-ジクロロインドフェノール(DCIP)を電子受容体として添加し、600nmにおける吸光度の減少をモニタリングすることでグルコースの定量が可能である。また、発色試薬としてニトロテトラゾリウムブルー(NTB)を加え、570nm吸光度を測定することにより生成するジホルマザンの量を決定し、グルコース濃度を算出することが可能である。なお、いうまでもなく、使用する発色試薬（変色試薬）はこれらに限定されない。

[0083] （酵素センサー）

ある実施形態においてグルコースは、酵素センサーにより検出又は測定され得る。酵素センサーは、グルコースデヒドロゲナーゼが固定化された電極を含み得る。また、電極には上記のメディエータが吸着していてもよい。酵素センサーの電極としては、例えばカーボン電極、金電極、白金電極などが挙げられ、この電極上にグルコースデヒドロゲナーゼを塗布または固定化することができる。さらに、導電性材料としてCo、Pd、Rh、Ir、Ru、Os、Re、N

i、Cr、Fe、Mo、Ti、Al、Cu、V、Nb、Zr、Sn、In、Ga、Mg、Pb、Au、Pt、Agのうち少なくとも一種類の元素を含む金属微粒子が含まれていてもよく、これらは、合金であっても、めっきを施したものであってよい。カーボンとして、カーボンナノチューブやカーボンブラック、グラファイト、フラーレン、及びその誘導体等も含まれる。ある実施形態において酵素センサーはグルコースセンサーであり得る。すなわち、ある実施形態において本開示は、前記の基質特異性改変剤及びグルコースセンサーを用いる、グルコースの検出方法又は測定方法を提供する。該グルコースセンサーは持続血糖測定や連続グルコースモニタリングに使用可能である。

[0084] 本開示の基質特異性改変剤を含む組成物又は試薬は、グルコースデヒドロゲナーゼを固定化した電極、又は酵素センサー等と共に、ポテンショスタットやガルバノスタットなどを用いて、種々の電気化学的測定に用いることができる。電気化学的測定法としては、アンペロメトリー、例えばクロノアンペロメトリー、ポテンシャルステップ・クロノアンペロメトリー、ボルタンメトリー、例えばサイクリックボルタンメトリー、微分パルスボルタンメトリー、ポテンショメトリー、クーロメトリーなどの様々な手法が挙げられる。例えばグルコース測定では、アンペロメトリー法により、グルコースが還元される際の電流を測定することで、試料中のグルコース濃度を算出することができる。印加電圧は条件や装置の設定にもよるが、例えば-1000mV～+1000mV(vs. Ag/AgCl)などとすることができる。

[0085] 電極として印刷電極を用いることもできる。これにより測定に必要な溶液量を低減することができる。電極は絶縁基板上に形成しうる。具体的には、フォトリゾグラフィ技術や、スクリーン印刷、グラビア印刷、フレキソ印刷などの印刷技術により、電極を基板上に形成させ得る。絶縁基板の素材としては、シリコン、ガラス、セラミック、ポリ塩化ビニル、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステルなどが挙げられ、各種の溶媒や薬品に対する耐性の強いものを用いることができる。また、電極の基盤としてカーボンクロスやカーボンペーパー、バッキーペーパーを用いることもできる。作用極の

面積は、所望の応答電流に応じて設定することができる。例えばある実施形態では、作用極の面積を1mm^{2}以上、1.5mm^{2}以上、2mm^{2}以上、2.5mm^{2}以上、3mm^{2}以上、4mm^{2}以上、5mm^{2}以上、6mm^{2}以上、7mm^{2}以上、8mm^{2}以上、9mm^{2}以上、10mm^{2}以上、12mm^{2}以上、15mm^{2}以上、20mm^{2}以上、30mm^{2}以上、40mm^{2}以上、50mm^{2}以上、1cm^{2}以上、2cm^{2}以上、3cm^{2}以上、4cm^{2}以上、5cm^{2}以上、例えば10cm^{2}以上とすることができる。ある実施形態では、作用極の面積を10cm^{2}以下、5cm^{2}以下、例えば1cm^{2}以下、とすることができる。対極も同様でありうる。また、作用極上にカーボンナノチューブやグラフェン、ケッチェンブラック等を固定化し、みかけの表面積を大きくすることも出来る。この場合、見かけの面積は10倍以上、50倍以上、100倍以上、1000倍以上増え得る。

[0086] ある実施形態において、本開示はグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤のスクリーニング方法を提供する。この方法は、

i) グルコースデヒドロゲナーゼを用意する工程、

ii) 該グルコースデヒドロゲナーゼのマルトースに対する反応性（Mal）とグルコースに対する反応性（Glu）の比（Mal/Glu）を決定する工程、

iii) 前記i)のグルコースデヒドロゲナーゼと候補物質とを接触させ、その後、候補物質の存在下での該グルコースデヒドロゲナーゼのマルトースに対する反応性（Mal）とグルコースに対する反応性（Glu）の比（Mal/Glu）を決定する工程、

iv) 前記ii)における比（Mal/Glu）と、iii)における候補物質の存在下での比（Mal/Glu）とを比較する工程、及び

v) 前記ii)における比（Mal/Glu）よりも、iii)における候補物質の存在下での比（Mal/Glu）が改変されている場合には、当該候補物質を、グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤とする工程を含む。候補物質は、グルコースのアナログである低分子化合物であり得る。

[0087] ある実施形態において、本開示はグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤の有効濃度を確認する方法を提供する。この方法は、

i) グルコースデヒドロゲナーゼ並びに第１濃度、第２濃度、・・・第n濃度

のグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤を用意する工程（nは自然数）、

ii） 前記第１濃度、第２濃度、・・・及び第n濃度のグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤存在下での、グルコースデヒドロゲナーゼのマルトースに対する反応性（Mal）とグルコースに対する反応性（Glu）の比（Mal/Glu）をそれぞれ決定する工程、

iii） 各濃度における比（Mal/Glu）を比較し、グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤の有効濃度を確認する工程、

を含む。例えばある実施形態において、特定の濃度nにおける比Mal/Gluが、グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤を添加しない場合の比Mal/Gluと実質的に同じであれば、グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤の有効濃度の下限値は、前記特定の濃度nとするか、それよりも高く設定しうる。ある実施形態において、特定の濃度nにおける比Mal/Gluが、グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤を濃度n-1にて添加した場合の比Mal/Gluと実質的に同じであれば、グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤の有効濃度の上限値は、前記特定の濃度nとするか、それよりも低く設定しうる。ただし、濃度nは濃度n-1よりも高濃度とする。

[0088] ある実施形態において本開示は、該スクリーニング方法により同定されたグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤を、グルコース測定試薬又はグルコース測定組成物に配合することを含む、グルコース測定試薬又はグルコース測定組成物の製造方法を提供する。またある実施形態において本開示は、該スクリーニング方法により同定されたグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤及びグルコースデヒドロゲナーゼを含む、グルコース測定試薬を提供する。

[0089] グルコースデヒドロゲナーゼの、マルトースに対する反応性（Mal）とグルコースに対する反応性（Glu）の比（Mal/Glu）は、以下の手順で決定することができる。カーボン印刷電極にN-イソプロピル-N'-フェニル-p-フェニレンジアミン(IPPD)を吸着固定し、グルコースデヒドロゲナーゼ、例えばムコー

ル属由来のグルコースデヒドロゲナーゼ又はアスペルギルス属由来のグルコースデヒドロゲナーゼをグルタルアルデヒドにより、架橋固定する。作用電極、対極、参照極の3極電極を用いて、+250 mV(Ag/AgCl)の電位を印加し、クロノアンペロメトリを行う。このとき、電流値が十分に安定した後、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中で終濃度1mMとなるようにマルトースを添加する（例えば測定開始から100秒後に添加）。次に、マルトース添加後、再度電流値が十分に安定した後、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中で終濃度1mMとなるようにグルコースを添加する（例えばマルトース添加から100秒後に添加）。グルコースデヒドロゲナーゼの基質特異性は、グルコースに対する反応性を１００％としたときのマルトースに対する反応性を測定することにより評価し得る。本明細書において、マルトースに対する反応性（Mal）とグルコースに対する反応性（Glu）の比をMal/Gluと表記することがある。反応性を応答電流により評価する場合には、反応性の比を応答電流の比ということができる。

[0090] 例えば、グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤の不在下において、あるグルコースデヒドロゲナーゼのMal/Gluが0.50%である場合、同じ測定条件で、ただしグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤の存在下での該グルコースデヒドロゲナーゼのMal/Gluが0.50%未満であれば、マルトースに対する反応性が低減しており、当該グルコースデヒドロゲナーゼの基質特異性が改変されたと言える。このようなグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤は、グルコース測定におけるマルトースの影響を低減させ得る。なお、グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤の不在下における、あるグルコースデヒドロゲナーゼのMal/Gluという相対値を100%と規定してもよい。この場合、同じ測定条件で、ただしグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤の存在下での該グルコースデヒドロゲナーゼのMal/Gluが100%未満であれば、マルトースに対する反応性が低減しており、当該グルコースデヒドロゲナーゼの基質特異性が改変された、と言える。また、グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤の存在下での該グルコースデヒドロゲナーゼのMal/Gluが100%以上であれば、マルトースに対する反応性が増大しており、

当該グルコースデヒドロゲナーゼの基質特異性が改変された、と言える。

[0091] ある実施形態において、グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤の不在下における、あるグルコースデヒドロゲナーゼのMal/Gluを100%とした場合、本開示のグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤の存在下での該グルコースデヒドロゲナーゼのMal/Glu比は、99%以下、98%以下、97%以下、96%以下、95%以下、94%以下、93%以下、92%以下、91%以下、90%以下、89%以下、88%以下、87%以下、86%以下、85%以下、84%以下、83%以下、82%以下、81%以下、80%以下、79%以下、78%以下、77%以下、76%以下、75%以下、74%以下、73%以下、72%以下、71%以下、70%以下、69%以下、68%以下、67%以下、66%以下、65%以下、64%以下、63%以下、62%以下、61%以下、60%以下、59%以下、58%以下、57%以下、56%以下、55%以下、54%以下、53%以下、52%以下、51%以下、50%以下、49%以下、48%以下、47%以下、46%以下、45%以下、44%以下、43%以下、42%以下、41%以下、40%以下、39%以下、38%以下、37%以下、36%以下、35%以下、34%以下、33%以下、32%以下、31%以下、30%以下、29%以下、28%以下、27%以下、26%以下、25%以下、24%以下、23%以下、22%以下、21%以下、20%以下、19%以下、18%以下、17%以下、16%以下、15%以下、14%以下、13%以下、12%以下、11%以下、10%以下、9%以下、8%以下、7%以下、6%以下、5%以下、4%以下、3%以下、2%以下、例えば1%以下、例えば実質的に0%、例えば0%、例えば99%～0%、99%～1%、98%～2%、97%～3%、96%～4%、95%～5%、94%～6%、93%～7%、92%～8%、91%～9%、90%～10%、89%～11%、88%～12%、87%～13%、86%～14%、85%～15%、84%～16%、83%～17%、82%～18%、81%～19%、80%～20%、79%～21%、78%～22%、77%～23%、76%～24%、75%～25%、74%～26%、73%～27%、72%～28%、71%～29%、70%～30%、69%～31%、68%～32%、67%～33%、66%～34%、65%～35%、64%～36%、63%～37%、62%～38%、61%～39%、60%～40%、59%～41%、58%～42%、57%～43%、56%～44%、55%～45%、54%～46%、53%～47%、52%～48%、51%～49%、例えば50%であり得る。

[0092] ある実施形態において、グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤の不在下における、あるグルコースデヒドロゲナーゼのMal/Gluを100%とした場

合、本開示のグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤の存在下での該グルコースデヒドロゲナーゼのMal/Glu比は、110%以上、120%以上、130%以上、140%以上、150%以上、160%以上、170%以上、180%以上、190%以上、200%以上、220%以上、240%以上、260%以上、280%以上、300%以上、例えば110%～300%、120%～280%、130%～260%、140%～240%、150%～220%、160%～200%、例えば170%～190%であり得る。特に断らない限り、本開示における数値範囲は、上限値及び下限値も含むものとする（例えば数値範囲a～bは、a以上かつb以下を意味する）。また、本開示は、数値範囲について例示される上限値と下限値のあらゆる組み合わせを包含するものとする。

[0093] 特定の理論に拘束されることを望むものではないが、本開示のグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤がGDHの基質特異性を改変しうるのは、次の作用機序によるものと考えられる。すなわち、グルコースデヒドロゲナーゼは、その基質ポケットによりグルコースを認識し作用することが知られているが、グルコースと類似する化学構造を有する化合物（グルコースアナログ）が、先に基質ポケットに入り、該基質ポケットにグルコース以外の夾雑糖、例えばマルトースが入るのを妨げるものと考えられる。なお、グルコースはC6化合物であり、グリセロールはC3化合物であるが、グリセロールはグルコースの一部分と構造が一致している、と見ることもでき、かつ、グリセロールについてもグルコースデヒドロゲナーゼの基質特異性を改変する作用が見られたことから、グリセロールが基質ポケットに入っているか又は基質ポケットと相互作用しているものと考えられる。

[0094] 本開示によりグルコースデヒドロゲナーゼの基質特異性を改変することができる。また本開示は、グルコースデヒドロゲナーゼの基質特異性を改変する他の方法と組み合わせることも可能である。例えば、基質特異性の高いグルコースデヒドロゲナーゼを探索し、見出した新たなグルコースデヒドロゲナーゼを、本開示のGDH基質特異性改変剤と組み合わせて用いることができる。また、例えば、GDHの基質特異性を改変し、改変されたGDH変異体を、本開示のGDH基質特異性改変剤と組み合わせて用いることができる。

[0095] ある実施形態において、本開示のグルコース測定法に用いられるグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤は、L-グロース、D-イジトール、L-イジトール、D-グルカール、ソルビトール、リビトール、及びトレハロース、並びにD-マンニトール、キシリトール、及びグリセロールからなる群より選択される１以上の化合物を含んでもよく、グルコースデヒドロゲナーゼはムコール属由来のFAD-GDH、例えばMucor prainii由来GDH（MpGDH）であってもよく、該FAD-GDHは電極に固定化されていてもよく、又は固定化されていなくともよい。

[0096] ある実施形態において、本開示のグルコース測定法に用いられるグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤は、L-グロース、D-イジトール、D-グルカール、ソルビトール、リビトール、及びトレハロース、並びにD-マンニトール、キシリトール、及びグリセロールからなる群より選択される１以上の化合物を含んでもよく、グルコースデヒドロゲナーゼはムコール属由来のFAD-GDH、例えばMucor RD056860 GDH(MrdGDH)であってもよく、該FAD-GDHは電極に固定化されていてもよく、又は固定化されていなくともよい。

[0097] ある実施形態において、本開示のグルコース測定法に用いられるグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤は、L-グロース、D-イジトール、D-グルカール、リビトール、及びトレハロース、並びにD-マンニトール、キシリトール、及びグリセロールからなる群より選択される１以上の化合物を含んでもよく、グルコースデヒドロゲナーゼはアスペルギルス属由来のFAD-GDH、例えばアスペルギルス・オリゼ又はアスペルギルス・テレウス由来FAD-GDH、若しくはGLD1であってもよく、該FAD-GDHは電極に固定化されていてもよく、又は固定化されていなくともよい。

[0098] 本開示の基質特異性改変剤を用いることにより、グルコースデヒドロゲナーゼの基質特異性を改変することができる。これによりグルコースデヒドロゲナーゼを用いて試料のグルコース濃度を測定するときに、マルトースによる影響を低減することができ、より正確なグルコース濃度測定が可能となる。これは糖尿病患者の血糖値管理などに有用であり得る。

[0099]（本開示の電極）

ある実施形態において本開示は、グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤を含む電極を提供する。ある実施形態において電極はアノード電極であり得る。ある実施形態において、本開示のアノード電極はグルコースデヒドロゲナーゼを有する。ある実施形態においてグルコースデヒドロゲナーゼは電池の有する電極に固定化されていてもよい。ある実施形態において、本開示のアノード電極はカソード電極と抵抗を組み合わせて電池を提供することができる。ある実施形態において本開示は、前記の電池を用いる発電方法を提供する。別の実施形態では、本開示のグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤を含む電池が提供される。

[0100]（本開示の燃料電池）

ある実施形態において本開示は、燃料電池用のアノード又はカソード及び当該アノード又はカソードを備えた燃料電池を提供する。この燃料電池は本開示のグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤を含む。ある実施形態において本開示は、前記のグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤を含む電池を使用した発電方法、並びに、グルコースデヒドロゲナーゼをアノード電極に固定化し、グルコースデヒドロゲナーゼに対応した基質、例えばグルコースを燃料とし、グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤の存在下で発電を行う方法を提供する。

[0101] ある実施形態において、本開示の燃料電池は、前記のグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤、アノード又はカソード、燃料槽、カソード、グルコースデヒドロゲナーゼを有するアノード、及び電解質を備えている。アノード又はカソードには、人工電子メディエータを吸着させてもよい。人工電子メディエータとしては上記に記載の公知のメディエータや、特許第6484741号及び特許6484742号に記載のフェニレンジアミン系化合物が挙げられるがこれに限らない。また本開示の燃料電池は、必要に応じて、アノードとカソードとの間に負荷抵抗を配置することができ、そのための配線を備えうる。ある実施形態において負荷抵抗は、本開示の燃料電池の一部である。ある実

施形態において、負荷抵抗は、本開示の燃料電池の一部ではなく、本開示の燃料電池は、適当な負荷抵抗に接続できるよう構成されている。本開示の燃料電池において酸化還元酵素（GDH）はアノードの一部を構成する。例えば酸化還元酵素はアノードに近接若しくは接触していてもよく、固定化されていてもよく、又は吸着していてもよい。燃料槽は電極に固定化された酸化還元酵素の基質となる化合物を含む。例えば、グルコースデヒドロゲナーゼを電極に固定化した場合、燃料はグルコースであり得る。ある実施形態において本開示の燃料電池はアノードとカソードを分離するイオン交換膜を有し得る。イオン交換膜は1nm～20nmの孔を有し得る。アノードは炭素電極のような一般的な電極であり得る。例えば、カーボンブラック、グラファイト、活性炭等の導電性炭素質からなる電極や、金、白金等の金属からなる電極を用いることができる。具体的には、カーボンペーパー、カーボンクロス、グラッシーカーボン、カーボンナノチューブ、HOPG（高配向性熱分解グラファイト）等が挙げられる。対をなすカソードとしては、例えば、白金や白金合金等、燃料電池において一般的に用いられている電極触媒を、カーボンブラック、グラファイト、活性炭のような炭素質材料、又は金、白金等からなる導電体に担持させた電極や、白金や白金合金等の電極触媒そのものからなる導電体をカソード電極として用い、酸化剤（カソード側基質、酸素等）を電極触媒に供給するような形態とすることができる。

[0102] 別の実施形態では、上記のような基質酸化型酵素電極からなるアノードと対をなすカソードとして、基質還元型酵素電極を使用しうる。酸化剤を還元する酸化還元酵素としては、ラッカーゼやビリルビンオキシターゼなど公知の酵素が挙げられる。酸化剤を還元する触媒として酸化還元酵素を用いる場合には、必要に応じて、公知の電子伝達メディエータを用いてもよい。酸化剤としては、酸素等が挙げられる。

[0103] ある実施形態において、カソードにおける電極反応を妨害する不純物（アスコルビン酸や尿酸等）による影響を回避するために、酸素選択性の膜（例えばジメチルポリシロキサンの膜）をカソード電極の周囲に配置することが

できる。

[0104] 本開示の発電方法は、酸化還元酵素を有するアノードに燃料となる酸化還元酵素の基質となる化合物を供給する工程を含む。酸化還元酵素を有するアノードに燃料が供給されると、基質が酸化され、同時に生成した電子を、酸化還元酵素は、該酸化酵素と電極との間の電子伝達を仲介する電子伝達メディエータ、例えばフェニレンジアミン系化合物へと受け渡し、該電子伝達メディエータによって導電性基材（アノード電極）へ電子が受け渡される。アノード電極から配線（外部回路）を通って電子がカソード電極に到達することで、電流が発生する。

[0105] 上記過程において発生するプロトン(H^+)は、電解質溶液内をカソード電極まで移動する。そして、カソード電極では、電解質溶液内をアノードから移動してきたプロトンと、外部回路を経てアノード側から移動してきた電子と、酸素や過酸化水素等の酸化剤（カソード側基質）とが反応して水が生成される。これを利用し発電を行うことができる。

[0106] ある実施形態において、アノードの燃料として生体内のグルコースを用いることができる。この場合、生体内のマルトースと反応してしまうと想定以上の電流が流れることもありえ、電流を制御するためにはグルコースのみに作用する基質特異性がグルコースデヒドロゲナーゼに求められると考えられる。本開示の基質特異性改変剤はこのような用途にも利用することができる。

[0107] 本開示のいくつかの説明では、グルコースデヒドロゲナーゼの、マルトースに対する反応性とグルコースに対する反応性との比（Mal/Glu）を「改変する」ことができる、と表現した。ここでいう「改変」は、「増大」及び「低減」を包含しうる。例えばグルコース濃度を測定するに当たりマルトースの影響を低減したい場合は、比（Mal/Glu）を低減することが好ましい。また、例えばグルコースとマルトースの混合物を燃料とする燃料電池にグルコースデヒドロゲナーゼを用いる場合、より高い電流値を得るために、比（Mal/Glu）を増大させることが好ましい。したがって、ある実施形態において本開示

は、グルコースデヒドロゲナーゼの比（Mal/Glu）を低減する方法のみならず、比（Mal/Glu）を増大させる方法、及びそのための基質特異性改変剤を提供する。これらの実施形態では、各説明における「改変」を「低減」又は「増大」と読み替えるものとする。本開示によれば、グルコースデヒドロゲナーゼを遺伝子操作により改変することなく、上記の基質特異性改変剤を用いて、GDHの基質特異性を、用途に応じて変化させることができる。

[0108] ある実施形態において、本開示はグルコースアナログであり低分子化合物であるグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤を用いることにより、グルコースデヒドロゲナーゼの基質特異性を改変する方法を提供する。別の実施形態において、本開示は、グルコースデヒドロゲナーゼの基質特異性を改変するための、グルコースアナログであり低分子化合物であるグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤の使用を提供する。別の実施形態において、本開示は、グルコースデヒドロゲナーゼの基質特異性の改変に使用するための、グルコースアナログであり低分子化合物であるグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤を提供する。ある実施形態において本開示の方法は医療行為を含まない。

実施例

[0109] 以下の実施例により、本発明をさらに例証する。ただし、本発明の技術的範囲は、それらの例により何ら限定されるものではない。

[0110] [実施例１]Mucor属由来GDH遺伝子の宿主への導入とGDH活性の確認

特許第4648993号に記載のMucor属由来GDH(MpGDH)のアミノ酸配列を配列番号１に、塩基配列を配列番号２に示す。特開2013-176363号の開示を参考に、配列番号３のアミノ酸配列を有するMrdGDHをコードする塩基配列を全合成した（配列番号４）。プラスミドpUC19のマルチクローニングサイトに対象遺伝子であるMpGDH遺伝子又はMrdGDH遺伝子を常法により挿入させたDNAコンストラクトを作製した。具体的には、pUC19は、In-Fusion HD Cloning Kit（クロンテック社）に付属されているpUC19 linearized Vectorを用いた。pUC19のマルチクローニングサイトにあるIn-Fusion Cloning Siteにて、MpGDH遺伝子

又はMrdGDH遺伝子を、上記したIn-Fusion HD Cloning Kitを使用して、キットに添付されたプロトコールに従って連結して、コンストラクト用プラスミド(pUC19-MpGDH、pUC19-MrdGDH)を得た。

[0111] これらの遺伝子をコウジカビ（Aspergillus sojae；アスペルギルス・ソーヤ）で発現させ、そのGDH活性を評価した。

[0112] 具体的には、MpGDH又はMrdGDHを取得することを目的として、GDH遺伝子を用いて、Double-joint PCR(Fungal Genetics and Biology, 2004年, 第41巻, p. 973-981）を行い、5’アーム領域－pyrG遺伝子－TEF1プロモーター遺伝子－フラビン結合型GDH遺伝子－3’アーム領域から成るカセットを構築し、下記の手順でアスペルギルス・ソーヤNBRC4239株由来pyrG破壊株（pyrG遺伝子の上流48bp、コード領域896bp、下流240bp欠損株）の形質転換に用いた。なお、pyrG遺伝子はウラシル栄養要求性マーカーである。500ml容三角フラスコ中の20mMウリジンを含むポリペプトンデキストリン液体培地100mlに、アスペルギルス・ソーヤNBRC4239株由来pyrG破壊株の分生子を接種し、30℃で約20時間振とう培養を行った後、菌体を回収した。回収した菌体からプロトプラストを調製した。得られたプロトプラスト及び20μgの対象遺伝子挿入DNAコンストラクトを用いて、プロトプラストPEG法により形質転換を行い、次いで0.5%(w/v)寒天及び1.2Mソルビトールを含むCzapek-Dox最少培地（ディフコ社；pH6）を用いて、30℃、5日間以上インキュベートし、コロニー形成能があるものとして形質転換アスペルギルス・ソーヤを得た。

[0113] 得られた形質転換アスペルギルス・ソーヤは、ウリジン要求性を相補する遺伝子であるpyrGが導入されることにより、ウリジン無添加培地に生育できるようになることで、目的の遺伝子が導入された株として選択できた。得られた菌株の中から目的の形質転換体を、PCRで確認して選抜した。

[0114] MpGDH又はMrdGDHの遺伝子により形質転換した形質転換アスペルギルス・ソーヤを用いて、それぞれのGDH生産を行った。

[0115] 200ml容三角フラスコ中のDPY液体培地(1%(w/v)ポリペプトン、2%(w/v)デキストリン、0.5%(w/v)酵母エキス、0.5%(w/v)KH2PO4、0.05%(w/v)$MgSO_4 \cdot 7H_2O$

；pH未調整）40mlに、各菌株の分生子を接種し、30℃で4日間、160rpmで振とう培養を行った。次いで、培養後の培養物から菌体をろ過し、得られた培地上清画分をAmicon Ultra-15, 30K NMWL（ミリポア社製）で10mLまで濃縮・脱塩し、150mM NaClを含む20mM リン酸カリウム緩衝液(pH6.5)に置換した。続いて、150mM NaClを含む20mM リン酸カリウム緩衝液(pH6.5)で平衡化したHiLoad 26/60 Superdex 200pg（GEヘルスケア社製）にアプライし、同緩衝液で溶出させ、GDH活性を示す画分を回収し、MpGDHの精製標品を得た。同様にしてMrdGDHの精製標品を得た。なお、これらの酵素はそのFAD結合部位を介してFADと結合している状態のものである（ホロ酵素）。

[0116] [実施例２]固定化酵素を用いた際の基質特異性改変剤の効果

12mg/mlのMpGDH精製標品を10μL、15mMの各グルコースアナログを10μL、20mM リン酸K緩衝液を10μL混合し、2時間以上静置した。SCREEN-PRINTED ELECTRODES(DropSens社製、製品番号DRP-C110)上に、N-イソプロピル-N'-フェニル-p-フェニレンジアミン(IPPD)を吸着固定させ、各MpGDHを12μg分を塗布し、室温乾燥させた。最後に、25%のグルタルアルデヒド蒸気中に電極を入れ、得られた電極を純粋で洗浄し、IPPD・MpGDH固定化電極とした。次に、専用コネクター (DRP-CAC)を用いてALS 電気化学アナライザー 814Dに接続し、PBS中にIPPD・GDH固定化電極とAg/AgCl参照極、白金対極を浸漬させ、クロノアンペロメトリ測定を行った。印加電圧は+250mV(Ag/AgCl)とした。このとき、電流値が十分に安定した後(測定開始から約100秒後)、PBS中で終濃度1mMとなるようにマルトースを添加した。次に、マルトース溶液添加後、再度電流値が十分に安定した後（マルトース添加から約100秒後）、終濃度1mMとなるようにグルコース溶液を添加した。マルトース添加前後の応答電流の差異をマルトースの応答電流値と記録し、グルコース添加前後の応答電流の差異をグルコースの応答電流値と記録した。マルトースの応答電流値をグルコースの応答電流値で割った値をマルトース/グルコース(%)として算出した。結果を表１に示す。ソルビトール、リビトール、L-グロース、D-イジトールは基質特異性を改変させた。さらに基質特異性改変剤を添加しなかったMpGDHのマル

トース/グルコースを100%とした場合、D-グルカールを添加した場合は69%となり基質特異性を改変させた。

[0117] [表1]

	MpGDH 野生型				
添加剤	-	5 mM	5 mM	5 mM	5 mM
		ソルビトール	リビトール	L グロース	D-イジトール
マルトース/グルコース(%)	0.46	0.2	0.08	0.34	0.1
相対値(%)	100%	43%	17%	74%	22%

[0118] 同様にして、Glucose Dehydrogenase(FAD-dependent)(BBI社製、Product Code:GLD1、以下GLD1と表記する）を用いて、基質特異性改変剤の効果を検証した。結果を表２に示す。L-グロース、D-イジトール、L－イジトール、トレハロース、D-グルカールは基質特異性を改変させた。

[0119] [表2]

	GLD1(Aspergillus)					
添加剤	-	5 mM	5 mM	5 mM	5 mM	5 mM
		L グロース	D-イジトール	L-イジトール	トレハロース	D-グルカール
マルトース/グルコース(%)	0.23	0	0.01	0	0.08	0.09
相対値(%)	100%	0%	4%	0%	35%	39%

[0120] 同様にして、MrdGDHを用いて、基質特異性改変剤の効果を検証した。結果を表３に示す。ソルビトール、D-イジトール、トレハロース、D-グルカールは基質特異性を改変させた。

[0121] [表3]

	MrdGDH				
添加剤	-	5 mM	5 mM	5 mM	5 mM
		ソルビトール	D-イジトール	トレハロース	D-グルカール
マルトース/グルコース(%)	23.2	17	19.3	14.4	18.1
相対値(%)	100%	73%	83%	62%	78%

[0122] [実施例３]固定化していない酵素を用いた際の基質特異性改変剤の効果

12mg/mlのMpGDH精製標品を10μL、15mMの各グルコースアナログを10μL、2

0mM リン酸K緩衝液を10μL混合し、2時間以上静置した。SCREEN-PRINTED ELECTRODES(DropSens社製、製品番号DRP-C110)上に、PBSを80μL、各MpGDH溶液を5μL、2mg/mlのmPMS溶液を10μL塗布・混合させた。印加電圧は+100mV(Ag/Ag+)とし、クロノアンペロメトリ測定を行った。電流値が十分に安定した後(測定開始から約100秒後)、終濃度5mMとなるようにマルトース溶液を添加し、ピペッティングにより混合した。電流値が十分に安定したところで測定を止め、マルトース添加前後の差異をマルトースの応答電流値とした。なお、マルトース溶液の代わりに純水を等量添加したところ、応答電流の増加は見られなかった。使用した印刷電極を超純水で十分に洗浄し、乾燥させ、上記と同様にクロノアンペロメトリ測定を行った。マルトース溶液の代わりにグルコース溶液を添加し、グルコースの応答電流値を計測した。マルトースの応答電流値をグルコースの応答電流値で割った値をマルトース/グルコース(%)として算出した。MpGDHのマルトース/グルコースを100%とした場合、ソルビトールを添加した場合は67%となり、リビトールを添加した場合は58%となり、L-グロースを添加した場合は56%となり、D-イジトールを添加した場合は84%となり、L-イジトールを添加した場合は68%となり、トレハロースを添加した場合は72%となり基質特異性を改変させた。酵素を固定化しない場合には、L-イジトールは基質特異性改変剤として働くことが分かった。

[0123] 同様にして、GLD1を用いて、基質特異性改変剤の効果を検証した。結果を表４に示す。リビトール、L-グロース、L－イジトール、トレハロース、D-グルカールは基質特異性を改変させた。

[0124] [表4]

	GLD1(Aspergillus)					
添加剤	-	5 mM リビトール	5 mM L グロース	5 mM L-イジトール	5 mM トレハロース	5 mM D-グルカール
マルトース/グルコース(%)	0.33	0.29	0.23	0.25	0.28	0.25
相対値(%)	100%	88%	70%	76%	85%	76%

[0125] 同様にして、MrdGDHを用いて、基質特異性改変剤の効果を検証した。結果を表５に示す。ソルビトール、リビトール、L-グロース、D-イジトール、ト

レハロースは基質特異性を改変させた。

[0126] [表5]

	MrdGDH					
添加剤	-	5 mM	5 mM	5 mM	5 mM	5 mM
		ソルビトール	リビトール	Lグロース	D-イジトール	トレハロース
マルトース/グルコース(%)	31	23	22	28	21.6	22
相対値(%)	100%	74%	71%	90%	70%	71%

[0127] [実施例４]カーボンクロス電極を用いた際の基質特異性改変剤の効果

80μlのN’N-ジフェニル-p-フェニレンジアミン(DPPD)を吸着固定した多層カーボンナノチューブ溶液(1.4 wt%、MWCNT溶液)を、5 mm角のカーボンクロス(東陽テクニカ社製)へ複数回に分けて塗布した。これを十分に乾燥させた後、超純水を用いて洗浄を行った。続いて、40 mg/ml野生型MpGDHと、超純水に溶解した100 mM各種グルコースアナログ20μlを等量混合した溶液を、MWCNT/DPPD固定化電極に20μl塗布し、室温で乾燥させた後、25%グルタルアルデヒド蒸気中に20分間入れることでMpGDHを架橋固定した。その後、上記と同様に超純水で洗浄を行い、MWCNT/DPPD/MpGDH固定化電極とした。次に、これをALS電気化学アナライザー814Dに接続し、PBS中にMWCNT/DPPD/MpGDH固定化電極、Ag/AgCl参照極、及び白金対極を浸漬させ、クロノアンペロメトリ測定を行った。印加電圧は+250 mV (Ag/AgCl)とした。この時、電流値が十分に安定した後(測定開始から約100秒後)、PBS中で終濃度1 mMとなるようにマルトースを添加した。次に、マルトース溶液添加後、再度電流値が十分に安定した後(マルトース添加から約50秒後)、終濃度1 mMとなるようにグルコース溶液を添加した。マルトース添加前後の応答電流の差異をマルトースの応答電流値として記録し、グルコース添加前後の応答電流の差異をグルコースの応答電流値として記録した。マルトースの応答電流値をグルコースの応答電流値で割った値をマルトース/グルコース(%)として算出した。これらの結果を下記の表に示す。L-グロース、L-イジトール、D-マンニトール、グリセロール、及びキシリトールはGDHの基質特異性を改変させた。また電極の形状に関わらず、各種グルコースアナログはGDHの基質特異性を改変できることが示された。

[0128] [表6]

	MpGDH 野生型					
添加剤	-	50 mM L-グロース	50 mM L-イジトール	50 mM D-マンニトール	50 mM グリセロール	50 mM キシリトール
マルトース/グルコース相対値(%)	100%	62%	58%	3%	29%	21%

[0129] [実施例５]カーボンクロス電極における、基質特異性改変剤の組み合わせによる効果

実施例４と同様に、MWCNT/DPPD/MpGDH固定化電極を作製した。ただし、40 mg/ml 野生型MpGDH 20μlと、超純水に溶解した100 mM グリセロール及び100 mM L-イジトールをそれぞれ10 μl混合した溶液を、MWCNT/DPPD固定化電極に20 μl塗布する工程のみ変えて作製した。その後、実施例４に記載の方法でクロノアンペロメトリ測定を行い、マルトース/グルコース (%)を算出した。その結果、基質特異性改変剤を添加しなかったMpGDHのマルトース/グルコース応答電流比を100%とした場合、グリセロールとL-イジトールを共に添加した場合は8%となり基質特異性を改変させた。したがって、25 mMのL-イジトールおよびグリセロールを共に添加した場合、50 mMの各物質を単独で用いた場合と比較して、基質特異性改変効果が大きく、異なるグルコースアナログを組み合わせることで基質特異性改変効果は相乗的に改変できることが分かった。

[0130] [実施例６]燃料電池の構築

実施例４で作製した、精製GDHとD-マンニトールを含む溶液を用いたカーボンクロス電極をアノード電極とした。ただしこの時、メディエータとしてDPPDの代わりにIPPDを用いた。また、多層カーボンナノチューブ溶液(1.4 wt%、MWCNT溶液)を吸着させたカーボンクロスに、10mg/mlのビリルビンオキシダーゼ（BOD、シグマ社製）を吸着固定することでカソード電極を作製した。アノード電極とカソード電極を結ぶ配線の間に、可変抵抗を接続し、さらにALS電気化学アナライザー 814D接続した。燃料槽は、PBS（pH 7.4）と200 mM D-グルコースを含む電解質溶液を用い、上記のアノード電極とカソード電極を

浸漬させた。室温にてポテンショスタットのテクニックであるオープンサーキットポテンシャルを利用して測定した。その結果、10 kΩ接続時に0.125 mA/cm^{2}の電流値を得た。

[0131] 特定の理論に拘束されることを望むものではないが、本開示の燃料電池について以下のように考察される。すなわち、実施例４において各種グルコースアナログの存在下GDHを固定化した電極を用いることで、高い基質特異性をもってグルコースと反応することができた。したがって例えば本開示のアノード電極を用いた燃料電池であれば、マルトースとグルコースが共存するような生体内の成分を燃料とする場合、例えば食事や輸液などを摂取し、一時的にマルトース濃度が上昇した際においた場合においても、一定の電流を流すことを可能とすることが期待される。基質特異性を改変するために、遺伝子操作を経て酵素を改変することがあり得るが、時間がかかり煩雑である。本開示によれば、用途に合わせてGDHの基質特異性を改変することができる。これは種々の用途において有利となる。

産業上の利用可能性

[0132] 本開示により、グルコースデヒドロゲナーゼの基質特異性を改変することができる。これによりグルコースデヒドロゲナーゼを用いて試料のグルコース濃度を測定するときに、マルトースによる影響を低減することができ、より正確なグルコース濃度測定が可能となる。これは糖尿病患者の血糖値管理などに有用であり得る。また、マルトースへの反応性を増大させるようにグルコースデヒドロゲナーゼの基質特異性を改変すれば、グルコースとマルトースの混合物を燃料に含めた燃料電池を用いるときに、より高い電流値を得ることが可能となる。

[0133] 本明細書において言及された文献はいずれも、参照によりその全内容を本明細書に組み入れる。

[0134] 配列の簡単な説明

配列番号１ Mucor prainii由来GDH（MpGDH） aa

配列番号２ MpGDH遺伝子DNA

配列番号３　Mucor RD056860 GDH(MrdGDH) aa

配列番号４　MrdGDH遺伝子DNA

請求の範囲

[請求項1] グルコースアナログであり低分子化合物であるグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤を用いることにより、グルコースデヒドロゲナーゼの基質特異性を改変する方法であって、FAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼ（FAD-GDH）を用いてグルコース測定を行うときに、グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤とグルコースデヒドロゲナーゼとを共存させることを含み、該改変剤の不在下での該グルコースデヒドロゲナーゼのマルトースに対する反応性（Mal）とグルコースに対する反応性（Glu）の比（Mal/Glu）と比較して、該改変剤の存在下での該グルコースデヒドロゲナーゼのマルトースに対する反応性（Mal）とグルコースに対する反応性（Glu）の比（Mal/Glu）が改変される、前記方法。

[請求項2] グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤がソルビトール、D-イジトール、L-イジトール、D-グルカール、リビトール、L-グロース、トレハロース、D-マンニトール、キシリトール、及びグリセロールからなる群より選択される１以上の化合物を含む、請求項１に記載の方法。

[請求項3] グルコースデヒドロゲナーゼがムコール属又はアスペルギルス属由来のグルコースデヒドロゲナーゼである、請求項１又は２に記載の方法。

[請求項4] グルコースデヒドロゲナーゼが固相表面に固定化されている、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。

[請求項5] グルコースデヒドロゲナーゼが固相表面に固定化されていない、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。

[請求項6] グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤であって、該改変剤はグルコースのアナログである低分子化合物であり、該改変剤の不在下でのFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼ（FAD-GDH）のマルトースに対する反応性（Mal）とグルコースに対する反応性（Glu）の比（

Mal/Glu）と比較して、該改変剤の存在下での該グルコースデヒドロゲナーゼのマルトースに対する反応性（Mal）とグルコースに対する反応性（Glu）の比（Mal/Glu）が改変される、前記グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤。

[請求項7] グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤がソルビトール、D-イジトール、L-イジトール、D-グルカール、リビトール、L-グロース、トレハロース、D-マンニトール、キシリトール、及びグリセロールからなる群より選択される１以上の化合物を含む、請求項６に記載の改変剤。

[請求項8] グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤がソルビトール、D-イジトール、L-イジトール、D-グルカール、リビトール、L-グロース、D-マンニトール、及びグリセロールからなる群より選択される１以上の化合物を含む、請求項６に記載の改変剤。

[請求項9] グルコースデヒドロゲナーゼがムコール属又はアスペルギルス属由来のグルコースデヒドロゲナーゼである、請求項６～８のいずれか１項に記載の改変剤。

[請求項10] 請求項６～９のいずれか１項に記載のグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤及び固相表面に固定化されたグルコースデヒドロゲナーゼを含む、グルコース測定用システム。

[請求項11] 請求項６～９のいずれか１項に記載のグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤及び固相表面に固定化されていないグルコースデヒドロゲナーゼを含む、グルコース測定用システム。

[請求項12] 請求項６～９のいずれか１項に記載のグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤及びグルコースデヒドロゲナーゼを含む、グルコース測定用組成物又はグルコース測定試薬。

[請求項13] グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤と、グルコースデヒドロゲナーゼとを、個別の試薬として含む、請求項１２に記載のグルコース測定用組成物又はグルコース測定試薬。

[請求項14] グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤と、グルコースデヒドロゲナーゼとを、同一試薬中に含む、請求項１２に記載のグルコース測定用組成物又はグルコース測定試薬。

[請求項15] 請求項６～９のいずれか１項に記載の改変剤又は請求項１０若しくは１１に記載のシステム、又は請求項１２～１４のいずれか１項に記載の組成物若しくは試薬を用いた、グルコース測定方法。

[請求項16] 以下の工程を含む、グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤のスクリーニング方法、

i） グルコースデヒドロゲナーゼを用意する工程、

ii） 該グルコースデヒドロゲナーゼのマルトースに対する反応性（Mal）とグルコースに対する反応性（Glu）の比（Mal/Glu）を決定する工程、

iii） 前記i)のグルコースデヒドロゲナーゼとグルコースのアナログである低分子化合物である候補物質とを接触させ、その後、候補物質の存在下での該グルコースデヒドロゲナーゼのマルトースに対する反応性（Mal）とグルコースに対する反応性（Glu）の比（Mal/Glu）を決定する工程、

iv） 前記ii)における比（Mal/Glu）と、iii)における候補物質の存在下での比（Mal/Glu）とを比較する工程、及び

v）前記ii)における比（Mal/Glu）よりも、iii)における候補物質の存在下での比（Mal/Glu）が改変されている場合には、当該候補物質を、グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤とする工程。

[請求項17] 請求項１６に記載の方法により同定されたグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤を、グルコース測定試薬又はグルコース測定組成物に配合することを含む、グルコース測定試薬又はグルコース測定組成物の製造方法。

[請求項18] 請求項１６に記載の方法により同定されたグルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤及びグルコースデヒドロゲナーゼを含む、グル

コース測定試薬。

[請求項19] グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤及びFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼ（FAD-GDH）を含む電極、ここで前記グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤は、ソルビトール、D-イジトール、L-イジトール、D-グルカール、リビトール、L-グロース、トレハロース、D-マンニトール、キシリトール、及びグリセロールからなる群より選択される１以上の化合物を含む、前記電極。

[請求項20] グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤及びFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼ（FAD-GDH）を含む電池、ここで前記グルコースデヒドロゲナーゼ基質特異性改変剤は、ソルビトール、D-イジトール、L-イジトール、D-グルカール、リビトール、L-グロース、トレハロース、D-マンニトール、キシリトール、及びグリセロールからなる群より選択される１以上の化合物を含む、前記電池。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2020/013544

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 27/327(2006.01)i; G01N 27/416(2006.01)i; H01M 8/16(2006.01)i; C12N 15/53(2006.01)i; C12Q 1/32(2006.01)i; C12N 9/04(2006.01)i; G01N 33/15(2006.01)i; G01N 33/483(2006.01)i; G01N 33/50(2006.01)i; C12N 11/00(2006.01)i

FI: C12Q1/32 ZNA; C12N15/53; C12N11/00; G01N33/483 F; G01N33/50 Z; G01N33/15 Z; G01N27/327 353T; G01N27/416 338; H01M8/16; C12N9/04 D ZNA

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)

G01N27/327; G01N27/416; H01M8/16; C12N15/53; C12Q1/32; C12N9/04; G01N33/15; G01N33/483; G01N33/50; C12N11/00

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2020
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Pub Med

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2013-224971 A (PANASONIC CORP.) 31.10.2013 (2013-10-31) claims 1-5, 9, paragraphs [0007], [0088]-[0089], [0091]	1, 2, 4-10 3, 20
Y	WO 2017/195765 A1 (KIKKOMAN CORPORATION) 16.11.2017 (2017-11-16) paragraphs [0005]-[0006]	3
Y	JP 2018-068287 A (KIKKOMAN CORPORATION) 10.05.2018 (2018-05-10) claims 2, 3	20
A	JP 2014-018096 A (KIKKOMAN CORPORATION) 03.02.2014 (2014-02-03)	1-20
A	JP 2015-139376 A (TOYOBO CO., LTD.) 03.08.2015 (2015-08-03)	1-20

☒ 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 29 May 2020 (29.05.2020)	Date of mailing of the international search report 16 June 2020 (16.06.2020)
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/JP2020/013544

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2015/060150 A1 (TOYOBO CO., LTD.) 30.04.2015 (2015-04-30)	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2020/013544

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 2013-224971 A	31 Oct. 2013	US 2009/0065356 A1 claims 1-4, paragraphs [0009], [0118]-[0120], [0122] WO 2007/123179 A1 EP 2017608 A1 KR 10-2008-0111548 A CN 101427128 A	
WO 2017/195765 A1	16 Nov. 2017	US 2019/0136285 A1 paragraphs [0005]- [0006] EP 3456823 A1	
JP 2018-068287 A	10 May 2018	(Family: none)	
JP 2014-018096 A	03 Feb. 2014	(Family: none)	
JP 2015-139376 A	03 Aug. 2015	(Family: none)	
WO 2015/060150 A1	30 Apr. 2015	US 2016/0265021 A1	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2020/013544

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

G01N 27/327(2006.01)i; G01N 27/416(2006.01)i; H01M 8/16(2006.01)i; C12N 15/53(2006.01)i; C12Q 1/32(2006.01)i; C12N 9/04(2006.01)i; G01N 33/15(2006.01)i; G01N 33/483(2006.01)i; G01N 33/50(2006.01)i; C12N 11/00(2006.01)i

FI: C12Q1/32 ZNA; C12N15/53; C12N11/00; G01N33/483 F; G01N33/50 Z; G01N33/15 Z; G01N27/327 353T; G01N27/416 338; H01M8/16; C12N9/04 D ZNA

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））

G01N27/327; G01N27/416; H01M8/16; C12N15/53; C12Q1/32; C12N9/04; G01N33/15; G01N33/483; G01N33/50; C12N11/00

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	１９７１－２０２０年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２０年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２０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）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); PubMed

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	JP 2013-224971 A (パナソニック株式会社) 31.10.2013 (2013-10-31) 請求項1-5及び9, [0007], [0088]-[0089], [0091]	1, 2, 4-19
Y		3, 20
Y	WO 2017/195765 A1 (キッコーマン株式会社) 16.11.2017 (2017-11-16) [0005]-[0006]	3
Y	JP 2018-068287 A (キッコーマン株式会社) 10.05.2018 (2018-05-10) 請求項2及び3	20
A	JP 2014-018096 A (キッコーマン株式会社) 03.02.2014 (2014-02-03)	1-20
A	JP 2015-139376 A (東洋紡株式会社) 03.08.2015 (2015-08-03)	1-20
A	WO 2015/060150 A1 (東洋紡株式会社) 30.04.2015 (2015-04-30)	1-20

☐ 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抵触するものではなく、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	国際調査報告の発送日
29.05.2020	16.06.2020

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
鈴木　崇之 4B 4152
電話番号 03-3581-1101 内線 3448

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2020/013544

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、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. ☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
　☑ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式

b. ☐ 国際出願とともに、ＰＣＴ規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表

c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
　☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(ＰＣＴ規則13の3.1(a))
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式（ＰＣＴ規則13の3.1(b)及びＰＣＴ実施細則第713号）

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2020/013544

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2013-224971 A	31.10.2013	US 2009/0065356 A1 Claims 1-4, [0009], [0118]-[0120], [0122] WO 2007/123179 A1 EP 2017608 A1 KR 10-2008-0111548 A CN 101427128 A	
WO 2017/195765 A1	16.11.2017	US 2019/0136285 A1 [0005]-[0006] EP 3456823 A1	
JP 2018-068287 A	10.05.2018	（ファミリーなし）	
JP 2014-018096 A	03.02.2014	（ファミリーなし）	
JP 2015-139376 A	03.08.2015	（ファミリーなし）	
WO 2015/060150 A1	30.04.2015	US 2016/0265021 A1	