

(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
2013 年 3 月 7 日(07.03.2013)



(10) 国際公開番号

WO 2013/031664 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 9/04 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) *C12Q 1/32* (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) *C12Q 1/54* (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/071380
- (22) 国際出願日: 2012 年 8 月 24 日(24.08.2012)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2011-184764 2011 年 8 月 26 日(26.08.2011) JP
特願 2011-222390 2011 年 10 月 7 日(07.10.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 池田食研株式会社 (IKEDA FOOD RESEARCH CO., LTD.) [JP/JP]; 〒7210956 広島県福山市箕沖町 9 5 番地 7 Hiroshima (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 本田 通済 (HONDA, Michinari) [JP/JP]; 〒7210956 広島県福山市箕沖町 9 5 番地 7 池田食研株式会社内 Hiroshima (JP). 滝 さやか(TAKI, Sayaka) [JP/JP]; 〒7210956 広島県福山市箕沖町 9 5 番地 7 池田食研株式会社内 Hiroshima (JP). 竹中 涼 (TAKENAKA, Ryo) [JP/JP]; 〒7210956 広島県福山市箕沖町 9 5 番地 7 池田食研株式会社内 Hiroshima (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所 (THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT OFFICE); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町 1 丁目 3 番 8 号 沢の鶴人形町ビル 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロパ (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, 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: FLAVIN-BINDING GLUCOSE DEHYDROGENASE

(54) 発明の名称: フラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼ

(57) Abstract: A flavin-binding glucose dehydrogenase which exhibits little variation in activity in response to the temperature environment, and a glucose-measuring method using the same are provided. The flavin-binding glucose dehydrogenase has characteristics (1) to (3). (1) Effect: exhibits glucose dehydrogenase activity in the presence of an electron acceptor; (2) substrate specificity: if the activity value for D-glucose is 100%, the activity values for maltose, D-galactose, D-fructose, sorbitol, lactose, and sucrose are 10% or lower; and (3) temperature characteristic: if the activity value at 30°C is 100%, the activity value range at 10-50°C is 20-150%.

(57) 要約: 温度環境による活性の変動が小さいフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼ及びそれを用いるグルコースの測定法を提供する。下記の性質(1)~(3)を有するフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼ。(1)作用:電子受容体存在下でグルコース脱水素酵素活性を示す;(2)基質特異性:D-グルコースに対する活性値を100%とした場合のマルトース、D-ガラクトース、D-フルクトース、ソルビトール、ラクトース及びスクロースに対する活性値が10%以下である;(3)温度特性:30°Cにおける活性値を100%とした場合に、10~50°Cにおける活性値の範囲が20~150%。



WO 2013/031664 A1

明 細 書

発明の名称：フラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼ

技術分野

[0001] 本発明は、グルコースの測定に有用なフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼ及びこれを用いるグルコースの測定方法に関する。

背景技術

[0002] 血液中のグルコース濃度の迅速かつ正確な測定は、糖尿病を診断するうえで重要である。グルコースの測定法としては、化学法と酵素法があるが、酵素法が特異性、安全性の点で優れている。当該酵素法の中でも、検体の微量化、測定時間の短縮、装置の小型化の点から、電気化学的バイオセンサが有利である。

[0003] そのようなバイオセンサに使用可能な酵素として、グルコースオキシダーゼが知られている。しかし、グルコースオキシダーゼは、血中の溶存酸素により測定誤差が生じるという問題があるため、いくつかのグルコースデヒドロゲナーゼが開発されてきた。グルコースデヒドロゲナーゼのうち、フラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼは、補酵素の添加を必要としないこと及び溶存酸素の影響を受けないことから、グルコースバイオセンサ用の酵素として注目されている（特許文献１～７）。これらのフラビン結合型デヒドロゲナーゼの中には、基質特異性に優れるもの（特許文献５）、５０℃における活性値を１００％とする場合に、１０℃における活性値が１５％以上、２０℃における活性値が３０％以上、６０℃における活性値が７０％以上であるもの（特許文献６）、アスペルギルス・オリゼ由来のＦＡＤ依存性グルコースデヒドロゲナーゼの組換え大腸菌の細胞破碎液で、３７℃における活性値を１００％とする場合に２５℃における相対的な活性値が改善された改変型酵素（特許文献７）等がある。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開2007-289148号公報

特許文献2：国際公開2007/139013号パンフレット

特許文献3：国際公開2008/001903号パンフレット

特許文献4：国際公開2004/058958号パンフレット

特許文献5：国際公開2010/140431号パンフレット

特許文献6：特開2010-057427号公報

特許文献7：国際公開2011/034108号パンフレット

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] しかしながら、これら従来のグルコースデヒドロゲナーゼの活性は、高温側で反応性が顕著に低下するものや高温側では反応性が強いが低温側で反応性が低下するものなど、温度帯によって活性の変動が大きく、広い温度帯でより活性の変動が小さい酵素が求められていた。

従って、本発明の課題は、10～50℃の広い温度帯において活性の変動が小さいフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼ及びそれを用いるグルコースの測定法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0006] そこで本発明は、種々の微生物由来のグルコースデヒドロゲナーゼを探索したところ、糸状菌由来のグルコースデヒドロゲナーゼの中に、グルコースに対する基質特異性が高く、かつ30℃における活性値を100%とした場合に、10～50℃における活性値が20～150%と、活性を測定する際の温度環境による活性の変動が極めて小さいフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼが存在し、これを用いれば様々な温度環境下で正確かつ再現性良く、グルコース濃度が測定できることを見出した。また、これらのフラビン型グルコースデヒドロゲナーゼ遺伝子のクローニングにも成功し、当該酵素を効率的に生産できることも見出した。

[0007] すなわち、本発明は、以下の[1]～[17]に関する。

[1] 下記の性質(1)～(3)を有するフラビン結合型グルコースデヒド

ロゲナーゼ：（１）作用：電子受容体存在下でグルコース脱水素酵素活性を示す；

（２）基質特異性：D-グルコースに対する活性値を１００％とした場合のマルトース、D-ガラクトース、D-フルクトース、ソルビトール、ラクトース及びスクロースに対する活性値が１０％以下である；

（３）温度特性：３０℃における活性値を１００％とした場合に、１０～５０℃における活性値の範囲が２０～１５０％である。

〔２〕酵素のポリペプチド部分の分子量が６０～７０kDaである〔１〕記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。

〔３〕至適温度が４０～４５℃である〔１〕又は〔２〕に記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。

〔４〕下記の性質（６）及び（７）を有する〔１〕～〔３〕のいずれかに記載のフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼ：

（６）至適pH：６．０～７．５；

（７）安定pH範囲：４．５～７．０。

〔５〕４０℃、１５分間の熱処理後の残存活性が７０％以上である〔１〕～〔４〕のいずれかに記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。

〔６〕糸状菌由来である〔１〕～〔５〕のいずれかに記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。

〔７〕キンカクキン科に属する糸状菌由来である〔１〕～〔６〕のいずれかに記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。

〔８〕以下の（ａ）、（ｂ）又は（ｃ）のアミノ酸配列を有し、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼ：

（ａ）配列番号２、４、６、８、１０、１２、１４又は１６に示されるアミノ酸配列、

（ｂ）配列番号２、４、６、８、１０、１２、１４又は１６に示されるアミノ酸配列において、１個～数個のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたアミ

ノ酸配列、又は

(c) 配列番号2若しくは10に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%、配列番号4、6、12若しくは14に示されるアミノ酸配列と少なくとも95%、又は配列番号8若しくは16に示されるアミノ酸配列と少なくとも70%の同一性を有するアミノ酸配列。

[9] 配列番号10、12、14又は16に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ以下の(i)～(v)の性質を有する精製されたフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼ:

- (i) グルコースの1位を酸化する、
- (i i) 実質的に酸素を電子受容体としない、
- (i i i) 安定pH: 4.5～7.0、
- (i v) 糖タンパク質である、及び
- (v) 酵素のポリペプチド部分の分子量が60～70kDaである。

[10] 糸状菌又は酵母に属するグルコースデヒドロゲナーゼ生産菌を培養し、培養物からグルコースデヒドロゲナーゼを採取することを特徴とする[1]～[9]のいずれかに記載のグルコースデヒドロゲナーゼの製造法。

[11] 被検試料と[1]～[9]のいずれかに記載のグルコースデヒドロゲナーゼを接触させる工程を含む該被検試料中のグルコースの測定方法。

[12] 測定時のpHが5.0～9.0であって、溶存酸素の影響を受けない[11]に記載のグルコースの測定方法。

[13] [1]～[9]のいずれかに記載のグルコースデヒドロゲナーゼを含有するグルコース測定試薬。

[14] pHが4.0～7.5である[13]に記載のグルコース測定試薬。

[15] [1]～[9]のいずれかに記載のグルコースデヒドロゲナーゼを含有するグルコース測定用バイオセンサ。

[16] 反応層のpHが4.0～7.5であって、溶存酸素の影響を受けない[15]に記載のグルコース測定用バイオセンサ。

[17] [8] 又は [9] 記載のグルコースデヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチド。

[18] 以下の (d)、(e) 又は (f) のポリヌクレオチド：

(d) 配列番号 1、3、5、7、9、11、13 又は 15 に示される塩基配列から成るポリヌクレオチド、

(e) (d) のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつグルコースデヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチド、

(f) 配列番号 1 若しくは 9 に示される塩基配列と少なくとも 90%、配列番号 3、5、11 若しくは 13 に示される塩基配列と少なくとも 95%、又は配列番号 7 若しくは 15 に示される塩基配列と少なくとも 70% の同一性を有する塩基配列からなり、かつグルコースデヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチド。

[19] 配列番号 9、11、13 又は 15 に示される塩基配列と少なくとも 60% の同一性を有する塩基配列からなり、開始コドンの A から 57 番目までの塩基を削除した改変遺伝子で、かつグルコースデヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチド。

[20] [18] 又は [19] に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

[21] [18] 若しくは [19] に記載のポリヌクレオチド又は [20] に記載のベクターを用いて作成された形質転換細胞。

[22] 糸状菌から調製された染色体 DNA 又は cDNA から、配列番号 17 及び 18 に記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いた PCR により、グルコースデヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチドの一部を取得する工程を含む、グルコースデヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチドの製造方法。

発明の効果

[0008] 本発明のフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼを用いれば、測定環境が 10～50℃ の間で変化しても、正確かつ再現性良く、血中グルコース

を測定することができる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]本発明グルコースデヒドロゲナーゼ（A）～（F）の吸収スペクトルを示す図である。

[図2]本発明グルコースデヒドロゲナーゼ（A）～（D）の熱安定性を示す図である。

[図3]本発明グルコースデヒドロゲナーゼ（A）～（F）の安定なpHの範囲を示す図である。

[図4]本発明グルコースデヒドロゲナーゼ（A）～（F）のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を示す図である。

[図5]本発明グルコースデヒドロゲナーゼ（A）～（D）の至適温度の範囲を示す図である。

[図6]本発明グルコースデヒドロゲナーゼ（A）～（E）の至適pHの範囲を示す図である。

[図7]本発明グルコースデヒドロゲナーゼ（A）～（F）によるグルコース量測定結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0010] 本発明のグルコースデヒドロゲナーゼは、フラビン結合型のグルコースデヒドロゲナーゼであり、補酵素としてのフラビンが結合した状態で活性を示す酵素である。例えば、EC 1. 1. 99. 10又はEC 1. 1. 99. 13に分類される酵素であり、好ましくはEC 1. 1. 99. 10に分類される酵素である。ここでフラビンとしては、フラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）、フラビンモノヌクレオチド（FMN）が挙げられる。

[0011] 本発明のグルコースデヒドロゲナーゼは、下記の性質（1）～（3）を有するものであり、特に下記（3）の性質を有する点に特徴がある。

[0012] （1）作用：電子受容体存在下でグルコース脱水素酵素活性を示す。

（2）基質特異性：D-グルコースに対する活性値を100%とした場合のマルトース、D-ガラクトース、D-フルクトース、ソルビトール、ラクト

ース及びスクロースに対する活性値が10%以下である。

(3) 温度特性：30℃における活性値を100%とした場合に、10～50℃における活性値が20～150%。

[0013] まず、本発明のグルコースデヒドロゲナーゼは、(1) 電子受容体存在下でグルコース脱水素酵素活性を示す。すなわち、電子受容体の存在下で、グルコースの水酸基を酸化してグルコノ- δ -ラク톤を生成する反応を触媒する。FAD結合型のグルコースデヒドロゲナーゼがグルコースに作用すると、補酵素FADはFADH₂となるが、電子受容体としてフェリシアン化物（例えば、「Fe(CN)₆」³⁻）を存在させると、FADH₂はこれをフェロシアン化物（この場合、「Fe(CN)₆」⁴⁻）へと変換し、自らはFADへと戻る。フェロシアン化物は電位を与えると、電子を電極に渡してフェリシアン化物へと戻るため、こうした電子伝達物質を電子受容体とすることにより、電気化学的なシグナル検出が可能になる。

[0014] 本発明のグルコースデヒドロゲナーゼの基質特異性は、D-グルコースに対する特異性が高いため、グルコースの測定に適している。本発明のグルコースデヒドロゲナーゼは、(2) D-グルコースに対する反応性に対してマルトース、D-ガラクトース、D-フルクトース、ソルビトール、ラクトース及びスクロースに対する反応性が低く、10%以下である。より詳細には、D-グルコースに対する活性値を100%とした場合のマルトース、D-ガラクトース、D-フルクトース、ソルビトール、ラクトース及びスクロースに対する活性値は10%以下であり、好ましくは8%以下、より好ましくは5%以下である。更に好ましくはD-グルコースに対する活性値を100%とした場合のD-フルクトース、ソルビトール、ラクトース及びスクロースに対する活性値は1%以下であって、特に好ましくは0.5%以下である。

[0015] 本発明のグルコースデヒドロゲナーゼは、(3) 30℃における活性値を100%とした場合に、10～50℃における活性値の範囲が20～150%である。当該10～50℃における活性値の下限は30%であるのが好ま

しく、40%であるのがより好ましく、50%であるのが更に好ましい。更に、当該10～50℃における活性値の上限値は140%であるのが好ましく、130%以上であるのがより好ましく、120%であるのが更に好ましく、110%であるのが特に好ましい。

また、30℃における活性値を100%とした場合に、10～45℃における活性値は20～150%であるのが好ましく、当該10～45℃における活性値の下限値は30%であるのがより好ましく、40%であるのが更に好ましく、50%であるのが特に好ましい。更に、当該10～45℃における活性値の上限値は140%であるのがより好ましく、130%であるのが更に好ましく、120%であるのが特に好ましく、110%であるのが最も好ましい。

また、45℃における活性値を100%とした場合に、10～45℃における活性値は20～120%であるのが好ましく、当該10～45℃における活性値の下限値は30%であるのがより好ましく、40%であるのが更に好ましく、50%であるのが特に好ましい。更に、当該10～45℃における活性値の上限は115%であるのがより好ましく、110%であるのが更に好ましく、105%であるのが特に好ましく、100%であるのが最も好ましい。

また、50℃における活性値を100%とした場合に、10℃における活性値は25%以上であるのが好ましく、30%以上であるのがより好ましく、40%以上であるのが更に好ましく、50%以上であるのが特に好ましい。更に、20℃における活性値は40%以上であるのが好ましく、50%以上であるのがより好ましく、60%以上であるのが更に好ましく、70%以上であるのが特に好ましい。

[0016] 本発明のグルコースデヒドロゲナーゼは、(4) 酵素のポリペプチド部分の分子量が60～70 kDaであるのが好ましく、更に60～65 kDaであるのがより好ましい。酵素のポリペプチド部分の分子量とは、糖鎖を除去したタンパク質部分をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分子量

を測定した場合の分子量のことである。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による酵素全体の分子量については、培養条件や精製条件等により変動し易く、糖鎖付加量が変われば分子量は異なり、組換え酵素においてはその宿主等によっても糖鎖の有無や糖付加量が変わり、分子量は異なってくる。

[0017] 本発明のグルコースデヒドロゲナーゼの（５）至適温度は、４０～４５℃であるのが好ましい。より詳細には、該酵素を、各種温度で、後述の酵素活性測定法により測定し、該酵素が最大活性を示す温度における活性値を１００％とした場合に、４０～４５℃で相対活性値が８０％以上であるのが好ましい。

[0018] 本発明のグルコースデヒドロゲナーゼの（６）至適pHは、６．０～７．５であるのが好ましい。より詳細には、該酵素を、各種pHの緩衝液を用いて、２５℃で後述の酵素活性測定法により測定し、該酵素が最大活性を示す緩衝液のpHにおける活性値を１００％とした場合に、pH６．０～７．５で相対活性値が８０％以上、又はpH５．０～９．０で相対活性値が４０％以上であるのが好ましい。

[0019] 本発明のグルコースデヒドロゲナーゼの（７）安定pH範囲は、４．５～７．０であるのが好ましい。より詳細には、該酵素を１００mM各種pHの緩衝液で２５℃、１６時間処理した後に、後述の酵素活性測定法により測定し、最も安定だったpHの緩衝液で処理した酵素の活性を１００％とした場合に、７０％以上の活性が残存する緩衝液のpHが４．５～７．０、又は４０％以上の活性が残存する緩衝液のpHが４．０～７．５であるのが好ましい。

[0020] 本発明のグルコースデヒドロゲナーゼは、（８）４０℃、１５分間熱処理した後の残存活性が７０％以上であるのが好ましい。より詳細には、該酵素を１００mMリン酸カリウム緩衝液（pH６．０）中で、４℃、１５分間処理した後に、後述の酵素活性測定法により測定した活性を１００％とした場合に、各温度で１５分間処理した後に、後述の酵素活性測定法により測定し

た残存活性が、40℃で70%以上、又は35℃で90%以上であるのが好ましい。

[0021] 本発明のグルコースデヒドロゲナーゼの具体例としては、後記実施例に示すように(A)～(D)の4種挙げられる。以下、各グルコースデヒドロゲナーゼについて説明する。

[0022] グルコースデヒドロゲナーゼ(A)は、下記の性質(1)～(3)を有するフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼであり、下記の性質(4)～(8)のいずれかを有するものが特に好ましい。

(1) 作用：電子受容体存在下でグルコース脱水素酵素活性を示す。

(2) 基質特異性：D-グルコースに対する活性値を100%とした場合のマルトース、D-ガラクトース、D-フルクトース、ソルビトール、ラクトース及びスクロースに対する活性値が10%以下である。

(3) 温度特性：30℃における活性値を100%とした場合に、10～50℃における活性値の範囲が20～150%であって、好適範囲は、基質濃度10mMの場合、好ましくは30～140%、より好ましくは40～130%、更に好ましくは50～120%；基質濃度50mMの場合、好ましくは30～140%、より好ましくは40～130%、更に好ましくは50～120%である。

45℃における活性値を100%とした場合に、10～45℃における活性値の好適範囲は20～120%であって、基質濃度10mMの場合、好ましくは30～120%、より好ましくは40～120%、更に好ましくは50～120%；基質濃度50mMの場合、好ましくは30～120%、より好ましくは30～110%、更に好ましくは40～110%である。

50℃における活性値を100%とした場合の好適範囲は、基質濃度10mMの場合、10℃における活性値が好ましくは25%以上、より好ましくは40%以上、更に好ましくは50%以上、特に好ましくは60%以上、20℃における活性値が好ましくは40%以上、より好ましくは50%以上、更に好ましくは60%以上、特に好ましくは80%以上；基質濃度50mM

の場合、10℃における活性値が好ましくは25%以上、より好ましくは30%以上、更に好ましくは40%以上、特に好ましくは45%以上、20℃における活性値が好ましくは40%以上、より好ましくは50%以上、更に好ましくは55%以上、特に好ましくは60%以上である。

(4) 酵素タンパクのポリペプチドの分子量が60~70kDaである。

(5) 至適温度が30~45℃である。

下記の性質(6)及び(7)：

(6) 至適pHが6.0~8.0である。

(7) 安定pH範囲が4.5~7.0である。

(8) 40℃、15分間の熱処理後の残存活性が70%以上である。

[0023] 当該グルコースデヒドロゲナーゼ(A)のD-グルコースに対するKm値は、約100~200mMである。また、当該グルコースデヒドロゲナーゼ(A)はDumontinia属由来であるのが好ましく、Dumontinia tuberosa由来であるのが特に好ましい。

[0024] グルコースデヒドロゲナーゼ(B)は、下記の性質(1)~(3)を有するフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼであり、下記の性質(4)~(8)のいずれかを有するものが特に好ましい。

(1) 作用：電子受容体存在下でグルコース脱水素酵素活性を示す。

(2) 基質特異性：D-グルコースに対する活性値を100%とした場合のマルトース、D-ガラクトース、D-フルクトース、ソルビトール、ラクトース及びスクロースに対する活性値が10%以下である。

(3) 温度特性：30℃における活性値を100%とした場合に、10~50℃における活性値の範囲が20~150%であって、好適範囲は、基質濃度10mMの場合、好ましくは30~140%、より好ましくは40~130%、更に好ましくは40~120%；基質濃度50mMの場合、好ましくは20~140%、より好ましくは30~140%、更に好ましくは30~130%である。

45℃における活性値を100%とした場合に、10~45℃における活

性値の好適範囲は20～120%であって、基質濃度10mMの場合、好ましくは30～120%、より好ましくは30～110%、更に好ましくは40～110%；基質濃度50mMの場合、好ましくは25～120%、より好ましくは25～110%、更に好ましくは30～110%である。

50℃における活性値を100%とした場合の好適範囲は、基質濃度10mMの場合、10℃における活性値が好ましくは25%以上、より好ましくは35%以上、更に好ましくは40%以上、特に好ましくは45%以上、20℃における活性値が好ましくは40%以上、より好ましくは50%以上、更に好ましくは60%以上、特に好ましくは65%以上；基質濃度50mMの場合、10℃における活性値が好ましくは25%以上、より好ましくは30%以上、20℃における活性値が好ましくは40%以上、より好ましくは45%以上、更に好ましくは50%以上である。

(4) 酵素タンパクのポリペプチドの分子量が60～70kDaである。

(5) 至適温度が35～50℃である。

下記の性質(6)及び(7)：

(6) 至適pHが6.0～7.5である。

(7) 安定pH範囲が4.5～7.0である。

(8) 40℃、15分間の熱処理後の残存活性が70%以上である。

[0025] 当該グルコースデヒドロゲナーゼ(B)のD-グルコースに対するKm値は、約10～40mMである。また、当該グルコースデヒドロゲナーゼ(B)は、*Ovulinia*属由来であるのが好ましく、*Ovulinia azaleae*由来であるのが更に好ましい。

[0026] グルコースデヒドロゲナーゼ(C)は、下記の性質(1)～(3)を有するフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼであり、下記の性質(4)～(8)のいずれかを有するものが特に好ましい。

(1) 作用：電子受容体存在下でグルコース脱水素酵素活性を示す。

(2) 基質特異性：D-グルコースに対する活性値を100%とした場合のマルトース、D-ガラクトース、D-フルクトース、ソルビトール、ラクト

ース及びスクロースに対する活性値が10%以下である。

(3) 温度特性：30℃における活性値を100%とした場合に、10～50℃における活性値の範囲が20～150%であって、好適範囲は、基質濃度10mMの場合、好ましくは20～140%、より好ましくは30～140%、更に好ましくは30～130%；基質濃度50mMの場合、好ましくは25～150%、より好ましくは30～150%、更に好ましくは35～150%；10～45℃における活性値の好適範囲は、基質濃度50mMの場合、好ましくは35～145%である。

45℃における活性値を100%とした場合に、10～45℃における活性値の好適範囲は20～120%であって、基質濃度10mMの場合、好ましくは25～120%、より好ましくは25～110%、更に好ましくは30～110%；基質濃度50mMの場合、好ましくは20～115%、より好ましくは20～110%、更に好ましくは25～110%である。

50℃における活性値を100%とした場合の好適範囲は、基質濃度10mMの場合、10℃における活性値が好ましくは25%以上、より好ましくは30%以上、20℃における活性値が好ましくは40%以上、より好ましくは45%以上、更に好ましくは50%以上、特に好ましくは55%以上；基質濃度50mMの場合、10℃における活性値が好ましくは25%以上、20℃における活性値が好ましくは40%以上である。

(4) 酵素タンパクのポリペプチドの分子量が60～70kDaである。

(5) 至適温度が40～50℃である。

下記の性質(6)及び(7)：

(6) 至適pHが5.5～7.5である。

(7) 安定pH範囲が5.0～8.0である。

(8) 40℃、15分間の熱処理後の残存活性が70%以上である。

[0027] 当該グルコースデヒドロゲナーゼ(C)のD-グルコースに対するKm値は、約10～30mMである。また、当該グルコースデヒドロゲナーゼ(C)は、*Sclerotinia*属由来であるのが好ましく、*Sclerot*

*inia sclerotiorum*由来であるのが更に好ましい。

[0028] グルコースデヒドロゲナーゼ (D) は、下記の性質 (1) ~ (3) を有するフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼであり、下記の性質 (4) ~ (8) のいずれかを有するものが特に好ましい。

(1) 作用：電子受容体存在下でグルコース脱水素酵素活性を示す。

(2) 基質特異性：D-グルコースに対する活性値を100%とした場合のマルトース、D-ガラクトース、D-フルクトース、ソルビトール、ラクトース及びスクロースに対する活性値が10%以下である。

(3) 温度特性：30℃における活性値を100%とした場合に、10~50℃における活性値の範囲が20~150%であって、好適範囲は、基質濃度10mMの場合、好ましくは20~140%、より好ましくは30~130%、更に好ましくは30~120%；基質濃度50mMの場合、好ましくは20~140%、より好ましくは30~130%、更に好ましくは40~120%；10~45℃における活性値の好適範囲は、基質濃度10mMの場合、好ましくは40~120%である。

45℃における活性値を100%とした場合に、10~45℃における活性値の好適範囲は20~120%であって、基質濃度10mMの場合、好ましくは30~120%、より好ましくは40~120%、更に好ましくは45~120%；基質濃度50mMの場合、好ましくは30~120%、より好ましくは35~120%、更に好ましくは40~120%である。

50℃における活性値を100%とした場合の好適範囲は、基質濃度10mMの場合、10℃における活性値が好ましくは25%以上、20℃における活性値が好ましくは40%以上；基質濃度50mMの場合、10℃における活性値が好ましくは25%以上、20℃における活性値が好ましくは40%以上である。

(4) 酵素タンパクのポリペプチドの分子量が60~70kDaである。

(5) 至適温度が30~45℃である。

下記の性質 (6) 及び (7)：

(6) 至適pHが5.5～7.5である。

(7) 安定pH範囲が4.5～7.0である。

(8) 40℃、15分間の熱処理後の残存活性が70%以上である。

[0029] 当該グルコースデヒドロゲナーゼ(D)のD-グルコースに対するKm値は、約20～50mMである。また当該グルコースデヒドロゲナーゼ(D)は、*Botrytis*属由来であるのが好ましく、*Botrytis fabae*由来であるのが更に好ましい。

[0030] 本発明のグルコースデヒドロゲナーゼの由来は特に制限されないが、糸状菌であるのが好ましく、より好ましくはビョウタケ目(*Helotiales*)に属する糸状菌であり、更に好ましくはキンカクキン科(*Sclerotiniaceae*)に属する糸状菌であり、特に好ましくはデュモンティニア属(*Dumontinia*)、オブリニア属(*Ovulinia*)、スクレロティニア属(*Sclerotinia*)、ボトリティス属(*Botrytis*)又はシボリニア属(*Ciborinia*)に属する糸状菌であり、最も好ましくはデュモンティニア・テュベロセ(*Dumontinia tuberosa*)、オブリニア・アザレア(*Ovulinia azaleae*)、スクレロティニア・スクレロティオルム(*Sclerotinia sclerotiorum*)、ボトリティス・ファバエ(*Botrytis fabae*)、ボトリティス・テュリパエ(*Botrytis tulipae*)又はシボリニア・カメリア(*Ciborinia camelliae*)である。

[0031] 本発明のグルコースデヒドロゲナーゼは、例えば、糸状菌又は酵母に属するグルコースデヒドロゲナーゼ生産菌を培養し、培養物から採取することにより製造することができる。

[0032] 本発明で使用される微生物の培養には、通常の微生物培養用培地が使用でき、炭素源、窒素源、無機物その他使用微生物が必要とする微量栄養素を程よく含有するものであれば、合成培地、天然培地の何れでも使用可能である。炭素源としては、グルコース、スクロース、デキストリン、澱粉、グリセ

リン、糖蜜などが使用できる。窒素源としては、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウムなどの無機塩類、DL-アラニン、L-グルタミン酸などのアミノ酸類、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、麦芽エキス、コーンステープリカーなどの窒素含有天然物が使用できる。無機物としては、リン酸一ナトリウム、リン酸二ナトリウム、リン酸一カリウム、リン酸二カリウム、硫酸マグネシウム、塩化第二鉄などを使用できる。

[0033] 本発明のグルコースデヒドロゲナーゼを得るための培養は、通常、振盪培養や通気攪拌などの方法による好氣的条件下で行うのがよく、20℃から50℃、かつpH4からpH8の範囲で行うのが好ましい。培養期間は2日から10日の範囲が好ましい。この様な方法で培養することにより、培養物中、特に培養液中にグルコースデヒドロゲナーゼを生成蓄積することができる。又は該培養方法により、培養微生物内にもグルコースデヒドロゲナーゼを生成蓄積することができる。ついで、培養物中からグルコースデヒドロゲナーゼを得る方法は、通常のタンパク質の精製方法が使用できる。この方法は、例えば、微生物を培養後、遠心分離などにより微生物を除き培養上清を得る方法、又は微生物を培養後、培養液を遠心分離して培養微生物を得、適当な方法で該培養微生物を破碎し、破碎液から遠心分離などによって上清液を得る方法である。これらの上清液中に含まれるグルコースデヒドロゲナーゼは、限外ろ過、塩析、溶媒沈殿、透析、イオン交換クロマトグラフィー、疎水吸着クロマトグラフィー、ゲルろ過、アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動などの適当な精製操作を組み合わせることによって精製できる。

[0034] 更に、本発明のグルコースデヒドロゲナーゼを得るための培養は、固体培地も使用できる。培養方法には特に制限はなく、静置培養によってもよく、培養物を常時混合するような回転培養や流動層培養などによっても行うことができるが、設備投資の少ない培養装置としては静置培養が好ましい。ついで、培養物中からグルコースデヒドロゲナーゼを得る方法は、通常のタンパク質の精製方法が使用できる。すなわち、培養物に水などの抽出剤を加えて

攪拌したのち、ふすまなどの培地固形分を遠心分離、ろ過などの分離法により除去して抽出液を得ることにより行うことができる。一方、菌体内に蓄積されたグルコースデヒドロゲナーゼの回収は、上記の抽出液を得た培養物残渣を海砂などの研磨剤とともに磨砕したのち、水などを加えて、菌体から遊離されたグルコースデヒドロゲナーゼを抽出する方法などで行うことができる。又は、全グルコースデヒドロゲナーゼを得るには、培養物全体を海砂などの研磨剤とともに磨砕したのち、水などを加えて、菌体から遊離されたグルコースデヒドロゲナーゼと培地中に分泌されたグルコースデヒドロゲナーゼの両方を一挙に抽出する方法などで行うことができる。これらの上清液中に含まれるグルコースデヒドロゲナーゼは、限外ろ過、塩析、溶媒沈殿、透析、イオン交換クロマトグラフィー、疎水吸着クロマトグラフィー、ゲルろ過、アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動などの適当な精製操作を組み合わせることによって精製できる。

[0035] 本発明者は、更に前記グルコースデヒドロゲナーゼのうち、*Dumontinia*属(i)、*Botrytis*属(ii)、*Ovulinia*属(iii)及び*Ciborinia*属(iv)に属する糸状菌由来のグルコースデヒドロゲナーゼ遺伝子のクローニングに成功した。より詳細には、*Dumontinia tuberosa*、*Botrytis tulipae*、*Ovulinia azaleae*及び*Ciborinia camelliae*由来のグルコースデヒドロゲナーゼの遺伝子のクローニングに成功した。

*Dumontinia*由来のグルコースデヒドロゲナーゼ遺伝子の塩基配列は配列番号1であり、その遺伝子がコードするアミノ酸配列は配列番号2である。また、*Dumontinia*由来のグルコースデヒドロゲナーゼのシグナル配列を除いたアミノ酸配列は配列番号10であり、それに対応する塩基配列は配列番号9である。

*Botrytis*由来のグルコースデヒドロゲナーゼ遺伝子の塩基配列は配列番号3であり、その遺伝子がコードするアミノ酸配列は配列番号4であ

る。また、*Botrytis*由来のグルコースデヒドロゲナーゼのシグナル配列を除いたアミノ酸配列は配列番号12であり、それに対応する塩基配列は配列番号11である。

*Ovulinia*由来のグルコースデヒドロゲナーゼ遺伝子の塩基配列は配列番号5であり、その遺伝子がコードするアミノ酸配列は配列番号6である。また、*Ovulinia*由来のグルコースデヒドロゲナーゼのシグナル配列を除いたアミノ酸配列は配列番号14であり、それに対応する塩基配列は配列番号13である。

*Ciborinia*由来のグルコースデヒドロゲナーゼ遺伝子の塩基配列は配列番号7であり、その遺伝子がコードするアミノ酸配列は配列番号8である。また、*Ciborinia*由来のグルコースデヒドロゲナーゼのシグナル配列を除いたアミノ酸配列は配列番号16であり、それに対応する塩基配列は配列番号15である。

[0036] 本発明のグルコースデヒドロゲナーゼは、以下の(a)、(b)又は(c)のアミノ酸配列を有し、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼであり、好ましくは糖タンパク質から成るフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼである。

(a) 配列番号2、4、6、8、10、12、14又は16に示されるアミノ酸配列。

(b) 配列番号2、4、6、8、10、12、14又は16に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列。

(c) 配列番号2若しくは10に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、配列番号4、6、12若しくは14に示されるアミノ酸配列と少なくとも95%、又は配列番号8若しくは16に示されるアミノ酸配列と少なくとも70%、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、更に好ましくは少なくとも85%、特に好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%の同一性を有す

るアミノ酸配列。

数個とは、好ましくは20個以下、より好ましくは15個以下、更に好ましくは10個以下、更に好ましくは5個以下、特に好ましくは3個以下である。

[0037] 更に本発明のグルコースデヒドロゲナーゼは、配列番号10、12、14又は16に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、好ましくは少なくとも65%、より好ましくは少なくとも70%、更に好ましくは少なくとも75%、更に好ましくは少なくとも80%、更に好ましくは少なくとも85%、更に好ましくは少なくとも90%、特に好ましくは少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ以下の(i)～(v)の性質を有する精製されたフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼである：

- (i) グルコースの1位を酸化する、
- (i i) 実質的に酸素を電子受容体としない、
- (i i i) 安定pH：4.5～7.0、
- (i v) 糖タンパク質である、及び
- (v) 酵素のポリペプチド部分の分子量が60～70kDa。

実質的に酸素を電子受容体としないとは、後述のグルコース酸化酵素活性測定方法により活性がみられない程度であり、2,6-ジクロロフェノールインドフェノールを電子受容体とした場合の反応性を100%とした場合に、酸素を電子受容体とした場合の反応性が好ましくは1%以下、より好ましくは0.5%以下、更に好ましくは0.1%以下、特に好ましくは0.05%以下である。

[0038] 本発明のポリヌクレオチドは、前記(a)、(b)又は(c)のアミノ酸配列を有するグルコースデヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチドであり、イントロンを含む塩基配列から成るポリヌクレオチドでも良く、宿主に応じたコドンユーセージに変更した塩基配列から成るポリヌクレオチドでもよい。更に、以下の(d)、(e)又は(f)のポリヌクレオチドである。

(d) 配列番号 1、3、5、7、9、11、13 又は 15 に示される塩基配列から成るポリヌクレオチド。

(e) (d) のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつグルコースデヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチド。

(f) 配列番号 1 若しくは 9 に示される塩基配列と少なくとも 90%、より好ましくは少なくとも 95%、配列番号 3、5、11 若しくは 13 に示される塩基配列と少なくとも 95%、又は配列番号 7 若しくは 15 に示される塩基配列と少なくとも 70%、好ましくは少なくとも 75%、より好ましくは少なくとも 80%、更に好ましくは少なくとも 85%、特に好ましくは少なくとも 90%、最も好ましくは 95% の同一性を有する塩基配列からなり、かつグルコースデヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチド。

[0039] 更に本発明のポリヌクレオチドは、配列番号 9、11、13 又は 15 に示される塩基配列と少なくとも 60%、好ましくは少なくとも 65%、より好ましくは少なくとも 70%、更に好ましくは少なくとも 75%、更に好ましくは少なくとも 80%、更に好ましくは少なくとも 85%、更に好ましくは少なくとも 90%、特に好ましくは少なくとも 95% の同一性を有する塩基配列からなり、開始コドンの A から 57 番目までの塩基を削除した改変遺伝子で、かつグルコースデヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチドである。該改変遺伝子を使用することで大腸菌などグラム陰性菌での組換え製造が可能になる他、分泌効率の良いシグナル配列を付加することも可能である。

[0040] アミノ酸配列及び塩基配列の同一性パーセンテージは、基準配列（本発明では配列番号 1～16）を照会配列として比較するアルゴリズムをもった公開又は市販されているソフトウェアを用いて計算することができる。例として、GeneDoc 又は GENETYX（ソフトウェア開発株式会社製）の Maximum Matching などを用いることができ、これらはデフォルトパラメーターで使用するすることができる。

[0041] 本発明において、ハイブリダイズに際しての「ストリンジントな条件下

でハイブリダイズ」の具体的な条件とは、例えば、50%ホルムアミド、5×SSC（150mM 塩化ナトリウム、15mM クエン酸三ナトリウム、10mM リン酸ナトリウム、1mM エチレンジアミン四酢酸、pH 7.2）、5×デンハート（Denhardt's）溶液、0.1%SDS、10%デキストラン硫酸及び100μg/mLの変性サケ精子DNAで42℃インキュベーションした後、フィルターを0.2×SSC中42℃で洗浄することを例示することができる。

[0042] 染色体DNAであるポリヌクレオチドやRNAは、例えば、糸状菌、好ましくはビョウタケ目に属する菌、より好ましくはキンカクキン科に属する菌から常法により調製することができる。プローブやプライマーは、WO2006/101239に記載のアスペルギルス・テレウス由来のフラビン結合型グルコース脱水素酵素の遺伝子配列、特許文献3に記載のアスペルギルス・オリゼ由来のフラビン結合型グルコース脱水素酵素の遺伝子配列の他、公知のフラビン結合型グルコース脱水素酵素の遺伝子配列に基づいて作成することができる。又は、これらのプローブやプライマーは、例えば本発明のポリヌクレオチドであるcDNAを適当な制限酵素で切断して作成することもできる。

[0043] 本発明のポリヌクレオチドは、作成した複数のオリゴヌクレオチドプローブを用いて当業者に公知のハイブリダイゼーションなどの方法によって上記染色体DNAライブラリーをスクリーニングすることによって取得することができる。プローブの標識は、当業者に公知の任意の方法、例えば、ラジオアイソトープ（RI）法又は非RI法によって行うことができるが、非RI法を用いることが好ましい。非RI法としては、蛍光標識法、ビオチン標識法、化学発光法等が挙げられるが、蛍光標識法を用いることが好ましい。蛍光物質としては、オリゴヌクレオチドの塩基部分と結合できるものを適宜に選択して用いることができるが、シアニン色素（例えば、Cy Dye TM シリーズのCy 3、Cy 5等）、ローダミン6G試薬、N-アセトキシ-N-2-アセチルアミノフルオレン（AAF）、AAIF（AAFのヨウ素誘導

体)などを使用することができる。

[0044] 本発明のポリヌクレオチドは、染色体DNAを鋳型としてPCR法によって得ることができる。更に、配列番号1、3、5、7、9、11、13又は15に代表されるcDNAであるポリヌクレオチドは、例えば、前記の菌から調製した全RNA又はmRNAを鋳型とするRT-PCR法によって得ることができる。又は、イントロンを含む該酵素のコード領域についてGENETYXなどの解析ソフトを用いてcDNAを決定し、PCR法によりイントロンを削除したポリヌクレオチドを得ることができる。尚、プライマーを設計する場合には、プライマー設計用の市販のソフトウェア、例えばOligo™ [National Bioscience Inc. (米国) 製]、GENETYX (ソフトウェア開発株式会社製) 等を用いることができる。

[0045] 本発明のポリヌクレオチドの取得方法は特に限定されないが、例えば次の方法で取得できる。配列番号17及び18のプライマー対を用いて、前記のRNAや染色体DNAを鋳型としてRT-PCR又はPCRを行い、本発明のグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の内部配列を解明する。該PCRにより得られた産物は、好ましくは1,100~1,300bpであり、より好ましくはイントロンを含まない場合は1,150~1,200bpであり、イントロンを含む場合は1,200~1,250bpである。次に該内部配列から設計したプライマーを用いて、5'-RACE法及び3'-RACE法を行い、本発明のグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の開始コドン周辺及び終止コドン周辺を解明する。続いて本発明のグルコースデヒドロゲナーゼをコードする開始コドンから終止コドンまでの全長遺伝子を増幅できるプライマーを設計し、本発明のポリヌクレオチドを取得することができる。又は、配列番号1、3、5又は7の全長遺伝子を増幅させたプライマーを用いて解明したい全長遺伝子を増幅できることもある。更に、シグナル部分をコードする塩基配列を除いたポリヌクレオチドが増幅できるように設計したプライマーを用いて、本発明のポリヌクレオチドを取

得することができる。又は配列番号 17 及び 18 を用いて得た PCR 産物を前記スクリーニング用のプローブとして用いることもできる。最終的に PCR で大量に増幅することにより本発明のポリヌクレオチドを製造することができる。

[0046] 本発明のポリヌクレオチドは、公知のミューテーション導入法や変異導入 PCR 法等によって改変して作成することができる。更に、染色体 DNA やその cDNA ライブラリーから、ヌクレオチド配列情報に基づいて作成したオリゴヌクレオチドを用いるプローブハイブリダイゼーション法によって取得することができる。ハイブリダイゼーションに際して、ストリンジェント条件を様々に変化させることによって、上記ポリヌクレオチドを取得することができる。ストリンジェント条件は、ハイブリダイゼーション及び洗浄工程における塩濃度、有機溶媒（ホルムアルデヒド等）の濃度、温度条件等によって規定され、例えば、米国特許 No. 6, 100, 037 号明細書等の開示されているような、当業者らに周知の様々な条件を採用することができる。

[0047] 文献（例えば Carruthers (1982) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47:411-418 ; Adams (1983) J. Am. Chem. Soc. 105:661 ; Belousov (1997) Nucleic Acid Res. 25:3440-3444 ; Frenkel (1995) Free Radic. Biol. Med. 19:373-380 ; Blommers (1994) Biochemistry 33:7886-7896 ; Narang (1979) Meth. Enzymol. 68:90 ; Brown (1979) Meth. Enzymol. 68:109 ; Beaucage (1981) Tetra. Lett. 22:1859 ; 米国特許第 4, 458, 066 号）に記載されているような周知の化学合成技術により、*in vitro* において本発明のポリヌクレオチドを合成することができる。

[0048] 本発明の組換えベクターは、クローニングベクター又は発現ベクターであ

り、インサートとしてのポリヌクレオチドの種類や、その使用目的等に応じて適宜のものを使用する。例えば、cDNA又はそのORF領域をインサートとしてフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼを生産する場合には、*in vitro*転写用の発現ベクターや、大腸菌、枯草菌等の原核細胞、酵母、カビなどの糸状菌、昆虫細胞、哺乳動物細胞等の真核細胞のそれぞれに適した発現ベクターを使用することもできる。

[0049] 本発明の形質転換細胞としては、例えば、大腸菌、枯草菌等の原核細胞や、酵母、カビなどの糸状菌、昆虫細胞、哺乳動物細胞等の真核細胞等を使用することができる。これらの形質転換細胞は、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法など公知の方法によって組換えベクターを細胞に導入することによって調製することができる。組換えベクター及び形質転換細胞の具体例として、下記実施例に示した組換えベクターと、このベクターによる形質転換大腸菌、形質転換酵母及び形質転換糸状菌が挙げられる。

[0050] 本発明のフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼを大腸菌などの微生物でDNAを発現させて生産させる場合には、微生物中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、DNAクローニング部位、ターミネーター配列等を有する発現ベクターに前記のポリヌクレオチドを組換えた発現ベクターを作成し、この発現ベクターで宿主細胞を形質転換したのち、得られた形質転換体を培養すれば、フラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼを微生物で大量生産することができる。この際、任意の翻訳領域の前後に開始コドンと停止コドンを付加して発現させれば、任意の領域を含むフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼ断片を得ることもできる。又は、他の蛋白質との融合蛋白質として発現させることもできる。この融合蛋白質を適当なプロテアーゼで切断することによっても目的とするフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼを取得することができる。大腸菌用発現ベクターとしては、pUC系、pBluescript II、pET発現システム、pGEX発現システム、pCold発現システムなどが例示できる。

[0051] 或いは、フラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼを真核細胞で発現させて生産させる場合には、前記ポリヌクレオチドを、プロモーター、スプライシング領域、ポリ（A）付加部位等を有する真核細胞用発現ベクターに挿入して組換えベクターを作成し、真核細胞内に導入すれば、フラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼを真核細胞で生産することができる。該酵素は糖タンパク質であることが好ましく、該酵素を発現させる形質転換細胞は真核細胞が好ましい。プラスミドのような状態で細胞内に維持することもできるし、染色体中に組みこませて維持することもできる。発現ベクターとしては、pKA1、pCDM8、pSVK3、pSVL、pBK-CMV、pBK-RSV、EBVベクター、pRS、pYE82などが例示できる。また、pIND/V5-His、pFLAG-CMV-2、pEGFP-N1、pEGFPC1などを発現ベクターとして用いれば、Hisタグ、FLAGタグ、GFPなど各種タグを付加した融合蛋白質としてフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼを発現させることもできる。真核細胞としては、サル腎臓細胞COS-7、チャイニーズハムスター卵巣細胞CHOなどの哺乳動物培養細胞、出芽酵母、分裂酵母、糸状菌、カイコ細胞、アフリカツメガエル卵細胞などが一般に用いられるが、フラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼを発現できるものであれば、いかなる真核細胞でもよい。発現ベクターを真核細胞に導入するには、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法など公知の方法を用いることができる。

[0052] フラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼを*in vitro*発現させて生産させる場合には、前記のポリヌクレオチドを、RNAポリメラーゼが結合できるプロモーターを有するベクターに挿入して組換えベクターを作成し、このベクターを、プロモーターに対応するRNAポリメラーゼを含むウサギ網状赤血球溶解物や小麦胚芽抽出物などの*in vitro*翻訳系に添加すれば、フラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼを*in vitro*で生産することができる。RNAポリメラーゼが結合できるプロモーターとしては、T3、T7、SP6などが例示できる。これらのプロモーターを含

むベクターとしては、pK A 1、pC D M 8、p T 3 / T 7 1 8、p T 7 / 3 1 9、p B l u e s c r i p t I I などが例示できる。

[0053] 本発明のグルコースデヒドロゲナーゼは、合成によるグルコースデヒドロゲナーゼや遺伝子工学によって得られた組換え型のグルコースデヒドロゲナーゼであってもよい。当業者は本発明の開示に基づいて容易にグルコースデヒドロゲナーゼを得ることができる。例えば、グルコースデヒドロゲナーゼについては、糸状菌を含む微生物や動植物などの天然物から抽出するほか、そのアミノ酸配列及びそれをコードする遺伝子の塩基配列をもとに合成法によって得ることができる。一方、組換え製造法としては、本発明のポリヌクレオチドを市販の発現ベクターなど公知の発現ベクターに挿入し、得られたプラスミドを使用して大腸菌や糸状菌などの宿主を形質転換し、形質転換体を培養して培養物から目的のグルコースデヒドロゲナーゼを得ることによって、工業的に製造することも可能である。本発明のグルコースデヒドロゲナーゼとしては、前記のように糖タンパク質であるのが好ましいので、糸状菌又は酵母（組み換え）などの真核細胞を培養し、培養物から採取するのが好ましい。更に、野生型の分泌シグナル配列遺伝子、ベクター内の分泌シグナル配列遺伝子又は宿主と同属の分泌シグナル配列遺伝子、好ましくは分泌効率の高い分泌シグナル配列遺伝子を利用して菌体外（培養液中）に分泌生産させるのが好ましく、菌体内に生産させるより大量に酵素を製造することができる。

[0054] 本酵素の活性測定においては、該酵素を、好ましくは終濃度 0.15 - 0.6 u n i t / m L になるように適宜希釈して用いる。なお、該酵素の酵素活性単位（u n i t）は1分間に1 μ m o l のグルコースを酸化する酵素活性である。本発明のグルコースデヒドロゲナーゼ（G L D）の酵素活性は、次の方法で測定できる。

[0055] （酵素活性測定法）

以下の手順に従って各溶液を混合し、吸光度を測定し、G L D 活性を調べた。

100 mMリン酸カリウム緩衝液（pH 6.0）1.00 mL、1 M D-グルコース溶液1.00 mL、超純水0.61 mL、3 mM 2,6-ジクロロフェノールインドフェノール（以下DCIPという）0.14 mL及び3 mM 1-メトキシ-5-メチルフェナジウムメチルサルフェイト（以下1-m-PMSという）0.20 mLを混合し、37℃で10分間保温後、酵素サンプル0.05 mLを添加し、反応を開始した。反応開始時から5分間、酵素反応の進行に伴う600 nmにおける吸光度の1分間あたりの減少量（ ΔA_{600} ）を測定し、直線部分から式1に従いGLD活性を算出した。この際、GLD活性は、37℃、pH 6.0で1分間に1 μmol のDCIPを還元する酵素量を1 Uと定義した。

[0056] [数1]

$$\text{酵素活性 (U/mL)} = \frac{-(\Delta A_{600} - \Delta A_{600\text{blank}}) \times 3.0 \times df}{10.8 \times 1.0 \times 0.05}$$

[0057] なお、式中の3.0は反応試薬+酵素溶液の液量（mL）、10.8はpH 6.0におけるDCIPのモル吸光係数（ $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ）、1.0はセルの光路長（cm）、0.05は酵素溶液の液量（mL）、 $\Delta A_{600\text{blank}}$ は酵素の希釈に用いた溶液を酵素溶液の代わりに添加して反応開始した場合の600 nmにおける吸光度の1分間あたりの減少量、dfは希釈倍率を表す。

[0058] 本発明のグルコースデヒドロゲナーゼは、特に限定されないが、例えばグルコース測定、測定試薬、バイオセンサ又はバイオ電池に用いることができる。本発明のグルコースデヒドロゲナーゼのうち、糖タンパク質であるグルコースデヒドロゲナーゼを各用途に用いるのが好ましい。具体的には、本発明のグルコースデヒドロゲナーゼは、前述のようにグルコースに対する特異性が高く、かつ室温でも高い活性を維持しており、更に測定時に溶存酸素の影響を受けないため、グルコース濃度、特に血中グルコース濃度の測定用として有用である。グルコースを含む被検試料、例えば血液と本発明のグルコースデヒドロゲナーゼとを接触させる工程により、被検試料中のグルコース

が測定できる。好ましくは測定時のpHが5.0～9.0であるグルコース測定方法であれば、酵素の反応性が良い。

[0059] 本発明のグルコースデヒドロゲナーゼは、グルコース測定試薬に用いることができる。該測定試薬は、牛血清アルブミン（BSA）若しくは卵白アルブミン、該酵素と作用性のない糖類若しくは糖アルコール類、カルボキシル基含有化合物、アルカリ土類金属化合物、アンモニウム塩、硫酸塩又はタンパク質等から成る群より選ばれる熱安定化剤、又は緩衝剤等の当業者に公知の他の任意成分を適宜含有させ、該酵素や試薬成分の熱安定性や保存安定性を高めることができる。好ましくは測定試薬のpHが4.0～7.5であれば、保存安定性が良い。更に、被験試料中に存在する、測定に影響を与える夾雑物質の影響を抑える公知の物質を、該測定試薬に含ませることができる。尚、該測定試薬の製造方法は特に限定されないが、好ましくはpH4.0～7.5の範囲で製造することができる。

[0060] 本発明のグルコースデヒドロゲナーゼは、バイオセンサに用いることができる。本発明のバイオセンサは、酵素として本発明のグルコースデヒドロゲナーゼを反応層に使用したセンサであればよい。好ましくは反応層のpHが4.0～7.5であれば、安定してセンサを保存することができる。例えば、該バイオセンサは、絶縁性基板上にスクリーン印刷や蒸着などの方法を利用して電極系を形成し、更に酸化還元酵素と電子受容体とを含む測定試薬を備えることによって作製される。このバイオセンサの測定試薬に基質を含む試料液を接触させると、測定試薬が溶解して酵素と基質が反応し、これにともなって電子受容体が還元される。酵素反応終了後、還元された電子受容体を電気化学的に酸化させ、このとき、このバイオセンサは得られる酸化電流値から試料液中の基質濃度を測定することが可能である。この他に、発色強度又はpH変化などを検知する方式のバイオセンサも構築可能である。これらのバイオセンサにより、測定対象物質を基質とする酵素を選択することによって、様々な物質の測定が可能である。例えば、酵素に本発明のグルコースデヒドロゲナーゼを選択すると、試料液中のグルコース濃度を測定するグ

ルコースセンサを作製することができる。

[0061] バイオセンサの電子受容体としては、電子の授受能に優れた物質を用いることができる。電子の授受能に優れた物質とは、一般的に「電子伝達体」、「メディエータ」あるいは「酸化還元媒介剤」と呼ばれる化学物質やタンパク質性の電子メディエータであり、これらに該当する化学物質として、例えば、特表2002-526759に挙げられた電子伝達体や酸化還元媒介剤などを利用してもよい。

[0062] 更に本発明のグルコース脱水素酵素は、バイオ電池に用いることができる。本発明のバイオ電池は、酸化反応を行うアノード極及び還元反応を行うカソード極から構成され、必要に応じてアノードとカソードを隔離する電解質層を含んで構成される。上記の電子メディエータ及びグルコース酸化還元酵素又は上記の融合体を含む酵素電極をアノード電極に使用し、基質を酸化することによって生じた電子を電極に取り出すと共に、プロトンが発生させる。一方、カソード側には、一般的にカソード電極に使用される酵素を使用すれば良く、例えばラッカーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ又はビリルビンオキシダーゼを使用し、アノード側で発生させたプロトンを酸素と反応させることによって水を生成させる。電極としては、カーボン、金、白金等、一般的にバイオ電池に使用される電極を用いることができる。

[0063] 尚、本発明を実施するために使用する様々な技術は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献等に基づいて当業者であれば容易かつ確実に実施可能である。例えば、遺伝子工学及び分子生物学的技術は Sambrook and Maniatis, in Molecular Cloning—A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989; Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N. Y., 1995などに記載の方法あるいはそこで引用された文献記載の方法又はそれらと実質的

に同様な方法や改変法に基づき実施可能である。更に、この発明における用語は基本的には IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature によるものであり、あるいは当該分野において慣用的に使用される用語の意味に基づくものである。

実施例

[0064] 以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、本発明はその要旨を超えない限り、以下の実施例によって限定されるものではない。又、本明細書中に引用される文献に記載された内容は、本明細書の一部として本明細書の開示内容を構成するものである。以下の実施例におけるグルコースデヒドロゲナーゼ活性の定量は前記の方法に従って行った。

[0065] [実施例 1]

(本発明のフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼの取得)

自然界から分離した菌株及び微生物保存機関（独立行政法人 製品評価技術基盤機構）から購入した、計約 3,800 株から GLD 生産菌の探索を行った結果、*Dumontinia tuberosa* NBRC30254、*Ovulinia azaleae* NBRC6610、*Sclerotinia sclerotiorum* NBRC9395、*Sclerotinia sclerotiorum* NBRC103652、*Botrytis fabae* NBRC5895、*Botrytis fabae* NBRC7171、*Botrytis tulipae* NBRC5896、*Ciborinia camelliae* NBRC103663 の培養ろ液に GLD 活性が確認できた。

[0066] (*Dumontinia* 属微生物由来 GLD の精製：グルコースデヒドロゲナーゼ (A))

前培養培地（D-グルコース 1.0%、大豆粉 2.0%、コーンステープリカー 0.5%、硫酸マグネシウム七水和物 0.1%、pH 7.0）0.05 L を 0.2 L 容バッフル付き三角フラスコに入れ、121℃、20 分オートクレーブ処理し、これに予めプレート上で培養した *Dumontini*

a t u b e r o s e NBRC30254を約0.5cm²分接種し、25℃、100rpmで3日間回転振盪培養をした。これを種培養として、5Lジャーファーマンターに入れオートクレーブ処理した上記培地3.5Lに0.05Lずつ接種し（ジャーファーマンター5基）、25℃、300rpm、1v/v/mで7日間培養した。培養終了後、培養液17.5Lをろ布でろ過し、ろ液を回収した。次いで、得られたろ液を遠心分離（7,000×g、30分）により上清を回収し、メンブレンフィルター（10μm、アドバンテック社製）で吸引ろ過し、培養上清とした。

[0067] 上記の培養上清を、分画分子量8,000の限外ろ過濃縮膜（ミリポア社製）を用いて濃縮し、濃縮後の酵素液に硫酸アンモニウムを50%飽和となるよう徐々に添加し、余分な蛋白質を沈殿させた。該酵素液を、一晚、4℃で放置後、遠心分離（7,000×g、30分）により上清を回収した。

[0068] この上清を緩衝液A1（50mMリン酸カリウム緩衝液、50%飽和硫酸アンモニウム、pH6.0）にて予め平衡化したブチルトヨパール650C（東ソー社製）カラム（φ3.00cm×20.0cm）に通液し、緩衝液A1で該カラムを洗浄した後、緩衝液A1から緩衝液B1（50mMリン酸カリウム緩衝液、pH6.0）のリニアグラジエントによってタンパクを溶出させた。溶出されたタンパクの内、活性画分を濃縮後、緩衝液C1（1mMリン酸カリウム緩衝液、pH6.0）で透析し、予め緩衝液C1で平衡化したDEAEセルファインA-500m（チッソ社製）カラム（φ2.10cm×22.0cm）に通液した。緩衝液C1で該カラムを洗浄した後、緩衝液C1から緩衝液D1（250mMリン酸カリウム緩衝液、pH6.0）のリニアグラジエントでタンパクを溶出させた。溶出されたタンパクの内、活性画分を濃縮後、緩衝液C1で透析し、予め緩衝液C1で平衡化したDEAEセルファインA-500m（チッソ社製）カラム（φ1.00cm×12.7cm）に通液した。緩衝液C1で該カラムを洗浄した後、緩衝液E1（40mMリン酸カリウム緩衝液、pH6.0）、緩衝液F1（70mMリン酸カリウム緩衝液、pH6.0）、緩衝液G（80mMリン酸カリウム緩

衝液、pH 6.0)のステップワイズでタンパクを溶出させた。溶出されたタンパクの内、活性画分を濃縮後、緩衝液H (50 mMリン酸カリウム緩衝液、0.2 N塩化ナトリウム、pH 6.0)で透析し、予め緩衝液Hで平衡化したTSK gel-G3000SW (東ソー社製)カラム (ϕ 2.15 cm $\times$ 60.0 cm)に通液した。溶出されたタンパクの内、活性画分を濃縮・脱塩し、水置換したDumontinia属由来GLDの精製酵素を得た。以降、Dumontinia属由来GLDの精製酵素をDuGLDと表記する。

[0069] [実施例2]

(Ovulinia属微生物由来GLDの精製：グルコースデヒドロゲナーゼ (B))

前培養培地 (D-グルコース1.0%、大豆粉2.0%、コーンステープリカー0.5%、硫酸マグネシウム七水和物0.1%、pH 7.0) 0.05 Lを0.2 L容バッフル付き三角フラスコに入れ、121℃、20分オートクレーブ処理し、これに予めプレート上で培養したOvulinia azaleae NBRC 6610を約0.5 cm²分接種し、25℃、100 rpmで3日間回転振盪培養をした。これを種培養として、5 Lジャーファーマンターに入れオートクレーブ処理した上記培地3.5 Lに0.05 Lずつ接種し (ジャーファーマンター5基)、25℃、300 rpm、1 v/v/mで4日間培養した。培養終了後、培養液17.5 Lをろ布でろ過し、ろ液を回収した。次いで、得られたろ液を遠心分離 (7,000 $\times$ g、30分)により上清を回収し、メンブレンフィルター (10 μ m、アドバンテック社製)で吸引ろ過し、培養上清とした。

[0070] 上記の培養上清を、分画分子量8,000の限外ろ過濃縮膜 (ミリポア社製)を用いて濃縮し、濃縮後の酵素液に硫酸アンモニウムを60%飽和となるよう徐々に添加し、余分な蛋白質を沈殿させた。該酵素液を、一晩、4℃で放置後、遠心分離 (7,000 $\times$ g、30分)により上清を回収した。

[0071] この上清を緩衝液A2 (50 mMリン酸カリウム緩衝液、60%飽和硫酸

アンモニウム、pH 6.0)にて予め平衡化したブチルトヨパール650C (東ソー社製)カラム(ϕ 2.20 cm $\times$ 21.3 cm)に通液し、緩衝液A2で該カラムを洗浄した後、緩衝液A2から緩衝液B1 (50 mMリン酸カリウム緩衝液、pH 6.0)のリニアグラジエントによってタンパクを溶出させた。溶出されたタンパクの内、活性画分を濃縮後、緩衝液C1 (1 mMリン酸カリウム緩衝液、pH 6.0)で透析し、予め緩衝液C1で平衡化したDEAEセルファインA-500m (チッソ社製)カラム(ϕ 2.20 cm $\times$ 10.8 cm)に通液した。緩衝液C1で該カラムを洗浄した後、緩衝液C1から緩衝液D2 (150 mMリン酸カリウム緩衝液、pH 6.0)のリニアグラジエントでタンパクを溶出させた。溶出されたタンパクの内、活性画分を濃縮後、緩衝液H (50 mMリン酸カリウム緩衝液、0.2 N塩化ナトリウム、pH 6.0)で透析し、予め緩衝液Hで平衡化したTSK gel-G3000SW (東ソー社製)カラム(ϕ 2.15 cm $\times$ 60.0 cm)に通液した。溶出されたタンパクの内、活性画分を濃縮・脱塩し、水置換したOvulinia属由来GLDの精製酵素を得た。以降、Ovulinia属由来GLDの精製酵素をOvGLDと表記する。

[0072] [実施例3]

(Sclerotinia属微生物由来GLDの精製：グルコースデヒドロゲナーゼ(C))

前培養培地(D-グルコース1.0%、大豆粉2.0%、コーンステイープリカー0.5%、硫酸マグネシウム七水和物0.1%、pH 7.0) 0.05 Lを0.2 L容バッフル付き三角フラスコに入れ、121℃、20分オートクレーブ処理し、これに予めプレート上で培養したSclerotinia sclerotiorum NBRC103652を約0.5 cm²分接種し、25℃、100 rpmで3日間回転振盪培養をした。これを種培養として、5 Lジャーファーマンターに入れオートクレーブ処理した上記培地3 Lに0.05 Lずつ接種(ジャーファーマンター5基)し、25℃、400 rpm、1 v/v/mで6日間培養した。培養終了後、培養液15 Lを

ろ布でろ過し、ろ液を回収した。次いで、得られたろ液を遠心分離（5,000×g、15分）により上清を回収し、メンブレンフィルター（10μm、アドバンテック社製）で吸引ろ過し、培養上清とした。

[0073] 上記の培養上清を、分画分子量8,000の限外ろ過濃縮膜（ミリポア社製）を用いて濃縮し、濃縮後の酵素液に硫酸アンモニウムを40%飽和となるよう徐々に添加し、余分な蛋白質を沈殿させた。該酵素液を、一晚、4℃で放置後、遠心分離（5,000×g、15分）により上清を回収した。

[0074] この上清を緩衝液A3（50mMリン酸カリウム緩衝液、40%飽和硫酸アンモニウム、pH7.0）にて予め平衡化したブチルトヨパール650C（東ソー社製）カラム（φ6.00cm×5.70cm）に通液し、緩衝液A3で該カラムを洗浄した後、緩衝液A3から緩衝液B2（50mMリン酸カリウム緩衝液、pH7.0）のリニアグラジエントによってタンパクを溶出させた。溶出されたタンパクの内、活性画分を濃縮後、緩衝液C2（1mMリン酸カリウム緩衝液、pH7.0）で透析し、予め緩衝液C2で平衡化したDEAEセルファインA-500m（チッソ社製）カラム（φ2.00cm×10.2cm）に通液した。緩衝液C2で該カラムを洗浄した後、緩衝液C2から緩衝液D3（500mMリン酸カリウム緩衝液、pH7.0）のリニアグラジエントでタンパクを溶出させた。溶出されたタンパクの内、活性画分を濃縮後、緩衝液E2（20mMリン酸カリウム緩衝液、pH7.0）で透析し、予め緩衝液E2で平衡化したDEAEセルファインA-500m（チッソ社製）カラム（φ1.00cm×12.7cm）に通液した。緩衝液E2で該カラムを洗浄した後、緩衝液E2から緩衝液F2（100mMリン酸カリウム緩衝液、pH7.0）のリニアグラジエントでタンパクを溶出させた。溶出されたタンパクの内、活性画分を濃縮・脱塩し、水置換した*Sclerotinia*属由来GLDの精製酵素を得た。以降、*Sclerotinia*属由来GLDの精製酵素をScGLDと表記する。

[0075] [実施例4]

（*Botrytis*属微生物由来GLDの精製：グルコースデヒドロゲナー

ぜ (D))

前培養培地 (D-グルコース 1.0%、大豆粉 2.0%、コーンステイプリカー 0.5%、硫酸マグネシウム七水和物 0.1%、pH 7.0) 0.05 L を 0.2 L 容バッフル付き三角フラスコに入れ、121℃、20分オートクレーブ処理し、これに予めプレート上で培養した *Botrytis fabae* NBRC 7171 を約 0.5 cm² 分接種し、25℃、130 rpm で 4 日間回転振盪培養をした。これを種培養として、5 L ジャーファーマンターに入れオートクレーブ処理した上記培地 3 L に 0.05 L ずつ接種し (ジャーファーマンター 5 基)、25℃、400 rpm、1 v/v/m で 4 日間培養した。培養終了後、培養液 15 L をろ布でろ過し、ろ液を回収した。次いで、得られたろ液を遠心分離 (5,000×g、15分) により上清を回収し、メンブレンフィルター (10 μm、アドバンテック社製) で吸引ろ過し、培養上清とした。

[0076] 上記の培養上清を、分画分子量 8,000 の限外ろ過濃縮膜 (ミリポア社製) を用いて濃縮し、濃縮後の酵素液に硫酸アンモニウムを 50% 飽和となるよう徐々に添加し、余分な蛋白質を沈殿させた。該酵素液を、一晩、4℃で放置後、遠心分離 (5,000×g、15分) により上清を回収した。

[0077] この上清を緩衝液 A 4 (20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液、50% 飽和硫酸アンモニウム、pH 5.0) にて予め平衡化したブチルトヨパール 650 C (東ソー社製) カラム (φ 6.0 cm × 11.3 cm) に通液し、緩衝液 A 4 で該カラムを洗浄した後、緩衝液 A 4 から緩衝液 B 3 (20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 5.0) のリニアグラジエントによってタンパクを溶出させた。溶出されたタンパクの内、活性画分を濃縮後、緩衝液 C 3 (1 mM 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 5.0) で透析し、予め緩衝液 C 3 で平衡化した SP トヨパール 650 M (東ソー社製) カラム (φ 4.6 cm × 11.4 cm) に通液し、緩衝液 D 4 (100 mM 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 5.0) でタンパクを溶出させた。透過した活性画分と吸着後溶出された活性画分とを合わせて濃縮し、緩衝液 C 3 で透析した後、予め緩衝液 C 3 で平衡化

したDEAEセルファインA-500m（チッソ社製）カラム（ ϕ 4.6cm $\times$ 12.0cm）に通液した。緩衝液C3で該カラムを洗浄した後、緩衝液C3から緩衝液E3（200mM酢酸ナトリウム緩衝液、pH5.0）のリニアグラジエントでタンパクを溶出させた。溶出されたタンパクの内、活性画分を濃縮・脱塩し、水置換したBotrytis属由来GLDの精製酵素を得た。以降、Botrytis属由来GLDの精製酵素をBoGLDと表記する。

[0078] [実施例5]

（Dumontinia属微生物由来GLD遺伝子のクローニング1）

（1）菌体培養

グルコース（ナカライ社製）1%（W/V）、脱脂大豆（昭和産業社製）2%（W/V）、コーンステープリカー（サンエイ糖化社製）0.5%（W/V）、硫酸マグネシウム七水和物（ナカライ社製）0.1%（W/V）及び水からなる液体培地をpH6.0に調整し、150mLを500mL容の坂口フラスコに入れ、121℃、20分間オートクレーブした。冷却したこの液体培地に、Dumontinia tuberosa NBRC30254株を接種し、15℃で90時間振とう培養した後、さらしを用いて、湿菌体を回収した。

[0079] （2）全RNAの単離

（1）で取得した湿菌体200mgを-80℃で凍結した後、ISOGEN II（ニッポンジーン社製）を用いて100 μ gの全RNAを抽出した。

[0080] （3）cDNAライブラリーの調製

全RNAから、逆転写酵素およびアダプター配列付きオリゴdTプライマーを用いた逆転写反応によりcDNAライブラリーを調製した。反応試薬は、「SMARTer RACE cDNA Amplification kit」（タカラバイオ株式会社製）を使用し、反応条件は説明書記載のプロトコールに準じて行った。

[0081] （4）GLD遺伝子のクローニング

(3) で取得した cDNA ライブラリーを鋳型とし、GLD 遺伝子を PCR 増幅した。プライマーは、本発明者らによって既に解明されていた複数の GLD 配列から共通配列を解析し、その共通配列を基に相同性の低い GLD 配列でも増幅するように、縮重塩基を用いて設計した。最終的に下記の配列番号 17、18 のプライマー対を用いて PCR を行ったところ、1,200 bp 程度の長さに相当するバンドが確認された。この DNA 断片を精製し、DNA Ligation Kit (タカラバイオ社製) を用いて、T-vector PMD20 (タカラバイオ社製) にライゲーションした。

得られたプラスミドを用い、公知の方法で大腸菌 JM109 コンピテントセル (タカラバイオ社製) を形質転換した。得られた形質転換体から illustra plasmid-Prep Mini Spin Kit を用いてプラスミドを抽出・精製し、プラスミドに含まれる前記増幅 DNA の遺伝子配列を決定した (1,171 bp)。更に、得られた内部配列を基に設計した下記の配列番号 19 のプライマーを用いた 5' RACE 法によって cDNA の上流を、配列番号 20 のプライマーを用いた 3' RACE 法によって cDNA の下流部分を PCR 増幅し、前記の方法に従って得られた DNA 断片の塩基配列解析を行った結果、配列番号 1 に示す全鎖長 1,770 bp の *Dumontinia tuberosa* NBRC30254 株由来 GLD 全長遺伝子配列が明らかとなった。当該遺伝子配列がコードする全長アミノ酸配列を配列番号 2 に示す。

配列番号 17 : 5' -GGAACCAAGTGGTCTAGTCATCGCAAAYCGKYTATCYGA-3'

配列番号 18 : 5' -TGGATACTTCCTCTTGCAAATGGTARYARRGCCCAATA-3'

配列番号 19 : 5' -GATCGCCGCAGGGGTGCCTGGTATCG-3'

配列番号 20 : 5' -GGTGCCGATGTCCCTACTGCAAATGGAG-3'

(プライマー配列中の Y は C 又は T、K は G 又は T、R は A 又は G)

[0082] (5) プラスミド pAFF4/DuGLD の構築

(4) で明らかになった全長アミノ酸配列から予想シグナル配列を除いた 17 番目以降のアミノ酸配列をコードする遺伝子を増幅できるようにプライ

マー（配列番号 21、22）を設計し、（3）で調製した cDNA を鋳型に PCR を行い、改変遺伝子を得た。このとき、配列番号 21 のプライマーは予めリン酸化しておいた。得られた PCR 産物を *Sa*II で処理した後に、予め *Nae*I、*Sa*II で処理し、*Nae*I の切断部位は脱リン酸化しておいた分泌型プラスミド pAFF2（独立行政法人産業技術総合研究所より分譲）に対して導入し、プラスミド pAFF3/*Du*GLD を取得した。続いて、pAFF3/*Du*GLD を鋳型とし、配列番号 21、23 のプライマー対を用いて PCR を行った。得られた PCR 産物を *Bg*III および *Sph*I で処理し、予め *Bg*III と *Sph*I で処理しておいたプラスミド pAFF3/*Du*GLD に対し導入し、プラスミド pAFF4/*Du*GLD を取得し、大腸菌 JM109 株に導入して形質転換した。得られた形質転換体のうち 5 クローンよりプラスミド DNA を調製し、*Bg*III と *Xba*I で処理したところ、全てのクローンで目的のサイズの断片が確認できた。そのうち 4 クローンについてプラスミドを調製してそのインサートの配列決定を行ったところ、全てのプラスミドにおいて目的の遺伝子が確認された（pAFF4/*Du*GLD）。以下の実験には pAFF4/*Du*GLD を用いた。

配列番号 21 : 5' -GGCAGATCTAGTCCTGACCTTAGTCTAACTTATGACTAT-3'

配列番号 22 : 5' -CTGCAGGTCGACGCATGCTTAAATATCCTCCTTGATCAAATCTGCCGC-3'

配列番号 23 : 5' -ACATGCATGCTCTAGATTAAATATCCTCCTTGATCAAATCTGCCGC-3',

[0083] （6）酵母の形質転換と GLD 活性の確認

調製した組換えベクター（pAFF4/*Du*GLD）を宿主酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 に導入した。導入には Frozen-EZ Yeast Transformation I Kit（ZYMO RESEARCH 社製）を用いた。得られた形質転換体をイーストエクストラクト（BD 社製）1.0%、トリプトン（BD 社製）2.0%、グルコース（和光純薬製）2.0% からなる YPD 培地 10

0 mLを加えた500 mL容の坂口フラスコに植菌し、30℃、120 rpmで72時間振とう培養した。培養後、遠心して上清を回収した。前述のGLD活性測定法に準じ、プレートリーダー（モレキュラーデバイス社製）を用いてGLD活性を測定した。GLD遺伝子を挿入していないプラスミド（pAFF4）で形質転換したコントロール株を用いて得られた上清中のGLD活性は0.1 U/mL以下であったのに対し、pAFF4/DuGLDを形質転換した株を用いて得られた上清中のGLD活性は1.6 U/mLであり、本発明のGLD活性が確認できた。この培養上清を分画分子量10,000の限外ろ過膜（ザルトリウス社製）を用いて濃縮し、Dumontinia属由来GLDの粗酵素を得た。

[0084] [実施例6]

（Dumontinia属微生物由来GLD遺伝子のクローニング2）

（1）プラスミドpSENS/DuGLD及びDuGLD-Atsigの構築

実施例5（3）で調製したcDNAを鋳型とし、配列番号1に記載の配列から設計した下記の配列番号34、35のプライマー対を用いてPCRを行い、全長DuGLD遺伝子を含むPCR産物を取得した。更に、DuGLDの予想シグナル配列をアスペルギルス・テレウス由来GLDのシグナル配列に置換する蛋白をコードするDuGLD-Atsig改変遺伝子を取得するためのPCRを、三段階で行った。リバープライマーは何れも配列番号35に記載のプライマーを使用した。一段階目のPCRは、前記PCR産物を鋳型として、DuGLDの予想シグナル配列を除いた17番目以降のアミノ酸配列をコードする遺伝子を増幅できるように設計したプライマー（配列番号36）をフォワードプライマーとして行った。二段階目のPCRは一段階目のPCR産物を鋳型として、配列番号37に記載のプライマーをフォワードプライマーとして行い、三段階目のPCRは二段階目のPCR産物を鋳型として、配列番号38に記載のプライマーをフォワードプライマーとして行い、DuGLD-Atsig改変遺伝子を含むPCR産物を取得した。

配列番号 3 4 : 5' -(TGACCAATTCCGCAGCTCGTCAAA)ATGAATCATTTACTTCCTGCTTTTGC-3'

配列番号 3 5 : 5' -((CGCTTCTAGA))GCATGCTTAAATATCCTCCTTGATCAAATCTGCC-3',

配列番号 3 6 : 5' -CCCTGTCCCTGGCAGTGGCGGCACCTTTGAGTCCTGACCTTAGTCTAACTTATG-3'

配列番号 3 7 : 5' -ATGTTGGGAAAGCTCTCCTTCCTCAGTGCCCTGTCCCTGGCAGTGGCGGCACCTTTG-3'

配列番号 3 8 : 5' -(TGACCAATTCCGCAGCTCGTCAAA)ATGTTGGGAAAGCTCTCCTTCCTCA-3'

(括弧内：転写増強因子、二重括弧内：p S E N S ベクター配列、下線部：制限酵素部位 (S p h I)、配列番号 3 6、3 7、3 8 の下線部：シグナル配列)

次に、上記全長 D u G L D 遺伝子を含む P C R 産物及び D u G L D - A t s i g 改変遺伝子を含む P C R 産物を各々鋳型とし、何れも配列番号 3 9、3 5 に記載のプライマー対を用いて各々 P C R を行い、N 末端側に制限酵素認識部位及びベクター配列を付加した。

配列番号 3 9 : 5' -((CCGTCCTCCAAGTTA))GTCGAC(TGACCAATTCCGCAGCTCGTCAAA)-3'

(括弧内：転写増強因子、二重括弧内：p S E N S ベクター配列、下線部：制限酵素部位 (S a l I))

公知文献 1 (A s p e r g i l l u s 属の異種遺伝子発現系、峰時俊貴、化学と生物、3 8、1 2、8 3 1 - 8 3 8、2 0 0 0) に記載してあるアスペルギルス・オリゼ由来のアミラーゼ系の改良プロモーターを使用し、その下流に上記で得られた二つの P C R 産物を各々結合させることで、遺伝子が発現可能な二つのプラスミドベクターを各々調製した。これらの発現用プラスミドベクターを各々大腸菌 J M 1 0 9 株に導入して形質転換し、得られた各形質転換体を培養して、集菌した菌体から、I l l u s t r a p l a s

mid-prep MINI Flow Kit (GEヘルスケア社製)を用いて各プラスミドを抽出した。各プラスミド中のインサートの配列解析を行ったところ、DuGLD遺伝子(配列番号1)又はDuGLD-Atsig改変遺伝子(配列番号48)が確認できた。

[0085] (2) 形質転換体の取得

(1)で抽出したプラスミドを用いて、公知文献2(Biosci. Biotech. Biochem., 61(8), 1367-1369, 1997)及び3(清酒用麹菌の遺伝子操作技術、五味勝也、醸協、494-502、2000)に記載の方法に準じて、DuGLD遺伝子又はDuGLD-Atsig改変遺伝子を挿入した組換えカビ(アスペルギルス・オリゼ)を各々作製し、得られた各組換え株をCzapex-Dox固体培地で各々純化した。宿主としては、アスペルギルス・オリゼNS4株を使用した。本菌株は、公知文献2にあるように、1997年(平成9年)に醸造試験所で育種され、転写因子の解析、各種酵素の高生産株の育種などに利用され、分譲されているものが入手可能である。

[0086] (3) 組換えカビ由来GLDの活性確認

パインデックス2%(松谷化学工業社製)(w/v)、トリプトン1%(BD社製)(w/v)、リン酸二水素カリウム0.5%(ナカライテスク社製)(w/v)、硫酸マグネシウム七水和物0.05%(w/v)(ナカライテスク社製)及び水からなる液体培地15mLを太試験管(22mm×200mm)に入れ、121℃、20分間オートクレーブした。冷却したこの液体培地に、(2)で取得した形質転換体を植菌し、30℃で4日間振とう培養した。培養終了後、遠心して上清を回収し、前述のGLD活性測定法に従い各々GLD活性(U/mL)を測定したところ、何れもGLD活性を確認でき、DuGLD-Atsig改変遺伝子で形質転換した組換えカビは、培養液1mL当たり500U/mLの生産性を確認できた。

[0087] [実施例7]

(Botrytis属微生物由来GLD遺伝子のクローニング1)

(1) 菌体培養

グルコース（ナカライ社製）1%（W/V）、脱脂大豆（昭和産業社製）2%（W/V）、コーンステープリカー（サンエイ糖化社製）0.5%（W/V）、硫酸マグネシウム七水和物（ナカライ社製）0.1%（W/V）及び水からなる液体培地をpH6.0に調整し、150mLを500mL容の坂口フラスコに入れ、121℃、20分間オートクレーブした。冷却したこの液体培地に、*Botrytis tulipae* NBRC5896株を接種し、15℃で90時間振とう培養した後、さらしを用いて、湿菌体を回収した。

[0088] (2) 全RNAの単離

(1)で取得した湿菌体200mgを−80℃で凍結した後、ISOGEN II（ニッポンジーン社製）を用いて100μgの全RNAを抽出した。

[0089] (3) cDNAライブラリーの調製

全RNAから、逆転写酵素およびアダプター配列付きオリゴdTプライマーを用いた逆転写反応によりcDNAライブラリーを調製した。反応試薬は、「SMARTer RACE cDNA Amplification kit」（タカラバイオ株式会社製）を使用し、反応条件は説明書記載のプロトコールに準じて行った。

[0090] (4) GLD遺伝子のクローニング

(3)で取得したcDNAライブラリーを鋳型とし、実施例5の(4)に記載の配列番号17、18のプライマー対を用いてPCRを行ったところ、1,200bp程度の長さに相当するバンドが確認された。このDNA断片を精製し、DNA Ligation Kit（タカラバイオ社製）を用いて、T-vector PMD20（タカラバイオ社製）にライゲーションした。

得られたプラスミドを用い、公知の方法で大腸菌JM109コンピテントセル（タカラバイオ社製）を形質転換した。得られた形質転換体からillustra plasmid-Prep Mini Spin Kitを用

いてプラスミドを抽出・精製し、プラスミドに含まれる前記増幅DNAの遺伝子配列を決定した（1, 174 bp）。

更に、得られた内部配列、及び本発明者らによって既に解明されていたGLD配列を基に設計した、下記の配列番号24のプライマーを用いた3' RACE法によってcDNAの下流部分を、配列番号25、26のプライマー対でGLD遺伝子をPCR増幅し、前記の方法に従って得られたDNA断片の塩基配列解析を行った結果、配列番号3に示す全鎖長1, 773 bpのGLD全長遺伝子配列が明らかとなった。当該遺伝子配列がコードする全長アミノ酸配列を配列番号4に示す。

配列番号24 : 5' -CGTTCGTCATGACGCTGGACGAGC-3'

配列番号25 : 5' -GAAGATCTATGTATCGTTTACTCTCTACATTTGC-3'

配列番号26 : 5' -GCTCTAGACTAAATGTCCTCCTTGATCAAATCTG-3'

[0091] (5) 酵母の形質転換とGLD活性の確認

(4)で明らかになった全長アミノ酸配列から予想シグナル配列を除いた17番目以降のアミノ酸配列をコードする改変遺伝子を増幅できるようにプライマー（配列番号27、28）を設計し、(3)で調製したcDNAを鋳型にPCRを行い、改変遺伝子を得た。PCR産物をアガロース電気泳動に供したところ、約1.8 kb付近にバンドが確認されたため、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega社製)を用いてゲル精製後、BglIIとXbaIで切断した。また、実施例5の(5)で作製したpAFF4/DuGLDも同制限酵素で処理し、制限酵素処理後のPCR産物をベクターにライゲーションし、大腸菌JM109株に導入して形質転換した。得られた形質転換体のうち5クローンよりプラスミドDNAを調製し、BglIIとXbaIで処理したところ、全てのクローンで目的のサイズの断片が確認できた。これら5クローンについてプラスミドを調製してそのインサートの配列決定を行ったところ、全てのプラスミドにおいて目的の遺伝子が確認された（pAFF4/BotGLD）。

配列番号 27 : 5' -GAAGATCTAGCACCGACTCTACTTTAACTTATG-3'

配列番号 28 : 5' -GCTCTAGACTACATGTCTTCCTTGATCAAATCTGC-3'

調製した組換えベクター (pAFF4/BotGLD) を宿主酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 に導入した。導入には Frozen-EZ Yeast Transformation II Kit (ZYMO RESEARCH 社製) を用いた。得られた形質転換体を イーストエクストラクト (BD 社製) 1.0%、トリプトン (BD 社製) 2.0%、グルコース (和光純薬製) 2.0% からなる YPD 培地 100 mL を加えた 500 mL 容の坂口フラスコに植菌し、30℃、120 rpm で 72 時間振とう培養した。培養後、遠心して上清を回収した。前述の GLD 活性測定法に準じ、プレートリーダーを用いて GLD 活性を測定した。コントロール株を用いて得られた上清中の GLD 活性は 0.1 U/mL 以下であったのに対し、pAFF4/BotGLD を形質転換した株を用いて得られた上清中の GLD 活性は 2.6 U/mL であり、本発明の GLD 活性が確認できた。

[0092] [実施例 8]

(Botrytis 属微生物由来 GLD 遺伝子のクローニング 2)

(1) プラスミド pSENS/BotGLD 及び BotGLD-Atsig の構築

実施例 7 (3) で調製した cDNA を鋳型とし、配列番号 3 に記載の配列から設計した下記の配列番号 40、41 のプライマー対を用いて PCR を行い、全長 BotGLD 遺伝子を含む PCR 産物を取得した。更に、BotGLD の予想シグナル配列をアスペルギルス・テレウス由来 GLD のシグナル配列に置換する蛋白をコードする BotGLD-Atsig 改変遺伝子を取得するための PCR を、三段階で行った。リバープライマーは何れも配列番号 41 に記載のプライマーを使用した。一段階目の PCR は、前記 PCR 産物を鋳型として、BotGLD の予想シグナル配列を除いた 17 番目以降のアミノ酸配列をコードする遺伝子を増幅できるように設計したプライマー

(配列番号 42) をフォワードプライマーとして行った。二段階目の PCR は一段階目の PCR 産物を鋳型として、配列番号 37 に記載のプライマーをフォワードプライマーとして行い、三段階目の PCR は二段階目の PCR 産物を鋳型として、配列番号 38 に記載のプライマーをフォワードプライマーとして行い、B o t G L D - A t s i g 改変遺伝子を含む PCR 産物を取得した。

配列番号 40 : 5' -(TGACCAATTCCGCAGCTCGTCAAA)ATGTATCGTTTACTCTCTACATTTGC-3'

配列番号 41 : 5' -((CGCTTCTAGA))GCATGCCTAAATGTCCTCCTTGATCAAATCTGC-3'

配列番号 42 : 5' -CCCTGTCCCTGGCAGTGGCGGCACCTTTGAGCACCGACTCTACTTTAACTTATG-3'

(括弧内：転写増強因子、二重括弧内：p S E N S ベクター配列、下線部：制限酵素部位 (S p h I)、配列番号 42 の下線部：A t シグナル配列)

次に、上記全長 B o t G L D 遺伝子を含む PCR 産物及び B o t G L D - A t s i g 改変遺伝子を含む PCR 産物を各々鋳型とし、何れも配列番号 39、41 に記載のプライマー対を用いて各々 PCR を行い、N 末端側に制限酵素認識部位及びベクター配列を付加した。

公知文献 1 (A s p e r g i l l u s 属の異種遺伝子発現系、峰時俊貴、化学と生物、38、12、831-838、2000) に記載してあるアスペルギルス・オリゼ由来のアミラーゼ系の改良プロモーターを使用し、その下流に上記で得られた二つの PCR 産物を各々結合させることで、遺伝子が発現可能な二つのプラスミドベクターを各々調製した。これらの発現用プラスミドベクターを各々大腸菌 J M 1 0 9 株に導入して形質転換し、得られた各形質転換体を培養して、集菌した菌体から、I l l u s t r a p l a s m i d - p r e p M I N I F l o w K i t (GEヘルスケア社製)を用いて各プラスミドを抽出した。各プラスミド中のインサートの配列解析を行ったところ、B o t G L D 遺伝子 (配列番号 3) 又は B o t G L D - A t s i g 改変遺伝子 (配列番号 50) が確認できた。

[0093] (2) 形質転換体の取得

(1) で抽出したプラスミドを用いて、公知文献2 (B i o s c i . B i o t e c h . B i o c h e m . , 6 1 (8) , 1 3 6 7 - 1 3 6 9 , 1 9 9 7) 及び3 (清酒用麹菌の遺伝子操作技術、五味勝也、醸協、4 9 4 - 5 0 2、2 0 0 0) に記載の方法に準じて、B o t G L D 遺伝子又はB o t G L D - A t s i g 改変遺伝子を挿入した組換えカビ (アスペルギルス・オリゼ) を各々作製し、得られた各組換え株をC z a p e k - D o x 固体培地で各々純化した。宿主としては、アスペルギルス・オリゼNS 4 株を使用した。本菌株は、公知文献2にあるように、1 9 9 7 年 (平成9 年) に醸造試験所で育種され、転写因子の解析、各種酵素の高生産株の育種などに利用され、分譲されているものが入手可能である。

[0094] (3) 組換えカビ由来G L D の活性確認

パインデックス2 % (松谷化学工業社製) (w / v)、トリプトン1 % (B D 社製) (w / v)、リン酸二水素カリウム0. 5 % (ナカライテスク社製) (w / v)、硫酸マグネシウム七水和物0. 0 5 % (w / v) (ナカライテスク社製) 及び水からなる液体培地1 5 m L を太試験管 (2 2 m m × 2 0 0 m m) に入れ、1 2 1 °C、2 0 分間オートクレーブした。冷却したこの液体培地に、(2) で取得した形質転換体を植菌し、3 0 °C で4 日間振とう培養した。培養終了後、遠心して上清を回収し、前述のG L D 活性測定法に従い各々G L D 活性 (U / m L) を測定したところ、何れもG L D 活性を確認でき、B o t G L D 遺伝子で形質転換した組換えカビは、培養液1 m L 当たり1 3 U / m L、B o t G L D - A t s i g 改変遺伝子で形質転換した組換えカビは、培養液1 m L 当たり3 6 U / m L の生産性を確認できた。

[0095] [実施例9]

(O v u l i n i a 属微生物由来G L D 遺伝子のクローニング)

(インサートDNAを含むベクターの調製)

(1) 菌体培養

グルコース (ナカライ社製) 1 % (W / V)、脱脂大豆 (昭和産業社製)

2% (W/V)、コーンステープリカー (サンエイ糖化社製) 0.5% (W/V)、硫酸マグネシウム七水和物 (ナカライ社製) 0.1% (W/V) 及び水からなる液体培地を pH 6.0 に調整し、150 mL を 500 mL 容の坂口フラスコに入れ、121℃、20 分間オートクレーブした。冷却したこの液体培地に、*Ovulinia azaleae* NBRC 6610 株を接種し、15℃で90時間振とう培養した後、さらしを用いて、湿菌体を回収した。

[0096] (2) 全RNAの単離

(1) で取得した湿菌体 200 mg を -80℃で凍結した後、ISOGEN II (ニッポンジーン社製) を用いて 100 µg の全RNAを抽出した。

[0097] (3) cDNAライブラリーの調製

全RNAから、逆転写酵素およびアダプター配列付きオリゴdTプライマーを用いた逆転写反応によりcDNAライブラリーを調製した。反応試薬は、「SMARTer RACE cDNA Amplification kit」(タカラバイオ株式会社製) を使用し、反応条件は説明書記載のプロトコールに準じて行った。

[0098] (4) GLD遺伝子のクローニング

(3) で取得したcDNAライブラリーを鋳型とし、実施例5の(4)に記載の配列番号17、18のプライマー対を用いてPCRを行ったところ、1,200 bp 程度の長さに相当するバンドが確認された。このDNA断片を精製し、DNA Ligation Kit (タカラバイオ社製) を用いて、T-vector PMD20 (タカラバイオ社製) にライゲーションした。

得られたプラスミドを用い、公知の方法で大腸菌 JM109 コンピテントセル (タカラバイオ社製) を形質転換した。得られた形質転換体から illustra plasmid-Prep Mini Spin Kit を用いてプラスミドを抽出・精製し、プラスミドに含まれる前記増幅DNAの遺伝子配列を決定した (1,174 bp)。

更に、得られた内部配列、及び本発明者らによって既に解明されていた G L D 配列を基に設計した下記の配列番号 29 のプライマーを用いた 3' R A C E 法によって c D N A の下流部分を、配列番号 30、31 のプライマー対で G L D 遺伝子を P C R 増幅し、前記の方法に従って得られた D N A 断片の塩基配列解析を行った結果、配列番号 5 に示す全鎖長 1, 773 b p の G L D 全長遺伝子配列が明らかとなった。当該遺伝子配列がコードする全長アミノ酸配列を配列番号 6 に示す。

配列番号 29 : 5' -CACATGGACATCCGACGCTAATACCCC-3'

配列番号 30 : 5' -ATGTATCGTTTACTCTCTACATTTGC-3'

配列番号 31 : 5' -CTACATGTCTTCCTTGATCAAATCTG-3'

[0099] (5) 酵母の形質転換と G L D 活性の確認

(4) で明らかになった全長アミノ酸配列から予想シグナル配列を除いた 17 番目以降のアミノ酸配列をコードする遺伝子を増幅できるようにプライマー (配列番号 32、33) を設計し、(3) で調製した c D N A を鋳型に P C R を行い、改変遺伝子を得た。P C R 産物をアガロース電気泳動に供したところ、約 1.8 k b 付近にバンドが確認されたため、W i z a r d S V G e l a n d P C R C l e a n - U p S y s t e m (P r o m e g a 社製) を用いてゲル精製後、B g I I I と X b a I で切断した。また、実施例 5 の (5) で作製した p A F F 4 / D u G L D も同制限酵素で処理し、制限酵素処理後の P C R 産物をベクターにライゲーションし、大腸菌 J M 109 株に導入して形質転換した。得られた形質転換体のうち 5 クローンよりプラスミド D N A を調製し、B g I I I と X b a I で処理したところ、全てのクローンで目的のサイズの断片が確認できた。これら 5 クローンについてプラスミドを調製してそのインサートの配列決定を行ったところ、全てのプラスミドにおいて目的の遺伝子が確認された (p A F F 4 / O v G L D)。

配列番号 32 : 5' -GAAGATCTAGCACCGACTCTACTTTAACTTATG-3'

配列番号 33 : 5' -GCTCTAGACTACATGTCTTCCTTGATCAAATCTG-3'

調製した組換えベクター（pAFF4／OvGLD）を宿主酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 に導入した。導入には Frozen-EZ Yeast Transformation I Kit（ZYMO RESEARCH 社製）を用いた。得られた形質転換体を イーストエクストラクト（BD 社製）1.0%、トリプトン（BD 社製）2.0%、グルコース（和光純薬製）2.0% からなる YPD 培地 100 mL を加えた 500 mL 容の坂口フラスコに植菌し、30℃、120 rpm で 72 時間振とう培養した。培養後、遠心して上清を回収した。前述の GLD 活性測定法に準じ、プレートリーダーを用いて GLD 活性を測定したところ、本発明の GLD 活性が確認できた。

[0100] [実施例 10]

（*Ciborinia* 属微生物由来 GLD 遺伝子のクローニング）

（1）菌体培養

グルコース（ナカライ社製）1%（W/V）、脱脂大豆（昭和産業社製）2%（W/V）、コーンステープリカー（サンエイ糖化社製）0.5%（W/V）、硫酸マグネシウム七水和物（ナカライ社製）0.1%（W/V）及び水からなる液体培地を pH 6.0 に調整し、150 mL を 500 mL 容の坂口フラスコに入れ、121℃、20 分間オートクレーブした。冷却したこの液体培地に、*Ciborinia camelliae* NBRC103663 株を接種し、15℃で90時間振とう培養した後、さらしを用いて、湿菌体を回収した。

[0101] （2）全 RNA の単離

（1）で取得した湿菌体 200 mg を -80℃ で凍結した後、ISOGEN II（ニッポンジーン社製）を用いて 100 µg の全 RNA を抽出した。

[0102] （3）cDNA ライブラリーの調製

全 RNA から、逆転写酵素およびアダプター配列付きオリゴ dT プライマーを用いた逆転写反応により cDNA ライブラリーを調製した。反応試薬は、「SMARTer RACE cDNA Amplification

k i t」(タカラバイオ株式会社製)を使用し、反応条件は説明書記載のプロトコールに準じて行った。

[0103] (4) G L D 遺伝子のクローニング

(3) で取得した c D N A ライブラリーを鋳型とし、実施例 5 の (4) に記載の配列番号 1 7、1 8 のプライマー対を用いて P C R を行ったところ、1, 2 0 0 b p 程度の長さに対応するバンドが確認された。この D N A 断片を精製し、D N A L i g a t i o n K i t (タカラバイオ社製)を用いて、T - v e c t o r P M D 2 0 (タカラバイオ社製)にライゲーションした。

得られたプラスミドを用い、公知の方法で大腸菌 J M 1 0 9 コンピテントセル(タカラバイオ社製)を形質転換した。得られた形質転換体から i l l u s t r a p l a s m i d - P r e p M i n i S p i n K i t を用いてプラスミドを抽出・精製し、プラスミドに含まれる前記増幅 D N A の遺伝子配列を決定した。更に、得られた内部配列を基に設計した下記の配列番号 4 3 のプライマーを用いた 5' R A C E 法によって c D N A の上流を、配列番号 4 4 のプライマーを用いた 3' R A C E 法によって c D N A の下流部分を P C R 増幅し、前記の方法に従って得られた D N A 断片の塩基配列解析を行った結果、配列番号 7 に示す全鎖長 1, 7 7 6 b p の C i b o r i n i a c a m e l l i a e N B R C 1 0 3 6 6 3 株由来 G L D 全長遺伝子配列が明らかとなった。当該遺伝子配列がコードする全長アミノ酸配列を配列番号 8 に示す。

配列番号 4 3 : 5' - A C G G A A A T G T T G T A C T T C T C A A G G A T A G C A - 3'

配列番号 4 4 : 5' - C G T C G T T G A T C T C C C A A C C G T C G G A G A G A A - 3'

[0104] (5) プラスミド p S E N S / C i G L D 及び C i G L D - A t s i g の構築

(3) で調製した c D N A を鋳型とし、配列番号 7 に記載の配列から設計した下記の配列番号 4 5、4 6 のプライマー対を用いて P C R を行い、全長 C i G L D 遺伝子を含む P C R 産物を取得した。更に、C i G L D の予想シ

グナル配列をアスペルギルス・テレウス由来GLDのシグナル配列に置換する蛋白をコードするCiGLD-Atsig改変遺伝子を取得するためのPCRを、三段階で行った。リバープライマーは何れも配列番号46に記載のプライマーを使用した。一段階目のPCRは、前記PCR産物を鋳型として、CiGLDの予想シグナル配列を除いた20番目以降のアミノ酸配列をコードする遺伝子を増幅できるように設計したプライマー（配列番号47）をフォワードプライマーとして行った。二段階目のPCRは一段階目のPCR産物を鋳型として、配列番号37に記載のプライマーをフォワードプライマーとして行い、三段階目のPCRは二段階目のPCR産物を鋳型として、配列番号38に記載のプライマーをフォワードプライマーとして行い、DuGLD-Atsig改変遺伝子を含むPCR産物を取得した。

配列番号45 : 5' - (CCGCAGCTCGTCAAA) ATGCATCGCTTCCTTCCTGCC-3'

配列番号46 : 5' - (GTTACGCTTCTAGA) GCATGCGTTCATTTACATATCTTCCTTGATC-3',

配列番号47 : 5' -GTGGCGGCACCTTTGGTTGCCTTAACCTACGATTAT-3'

（括弧内：転写増強因子、二重括弧内：pSENSベクター配列、下線部：制限酵素部位（SphI）、配列番号47の下線部：シグナル配列）

次に、上記全長CiGLD遺伝子を含むPCR産物及びCiGLD-Atsig改変遺伝子を含むPCR産物を各々鋳型とし、何れも配列番号39、46に記載のプライマー対を用いて各々PCRを行い、N末端側に制限酵素認識部位及びベクター配列を付加した。

公知文献1（*Aspergillus*属の異種遺伝子発現系、峰時俊貴、化学と生物、38、12、831-838、2000）に記載してあるアスペルギルス・オリゼ由来のアミラーゼ系の改良プロモーターを使用し、その下流に上記で得られた二つのPCR産物を各々結合させることで、遺伝子が発現可能な二つのプラスミドベクターを各々調製した。これらの発現用プラスミドベクターを各々大腸菌JM109株に導入して形質転換し、得られた各形質転換体を培養して、集菌した菌体から、Illustra plus

mid-prep MINI Flow Kit (GEヘルスケア社製)を用いて各プラスミドを抽出した。各プラスミド中のインサートの配列解析を行ったところ、CiGLD遺伝子(配列番号7)又はCiGLD-Atsig改変遺伝子(配列番号52)が確認できた。

[0105] (6) 形質転換体の取得

(5)で抽出したプラスミドを用いて、公知文献2(Biosci. Biotech. Biochem., 61(8), 1367-1369, 1997)及び3(清酒用麹菌の遺伝子操作技術、五味勝也、醸協、494-502、2000)に記載の方法に準じて、CiGLD遺伝子又はCiGLD-Atsig改変遺伝子を挿入した組換えカビ(アスペルギルス・オリゼ)を各々作製し、得られた各組換え株をCzapex-Dox固体培地で各々純化した。宿主としては、アスペルギルス・オリゼNS4株を使用した。本菌株は、公知文献2にあるように、1997年(平成9年)に醸造試験所で育種され、転写因子の解析、各種酵素の高生産株の育種などに利用され、分譲されているものが入手可能である。

[0106] (7) 組換えカビ由来CiGLD、及びCiGLD-Atsigの確認

パインデックス2%(松谷化学工業社製)(w/v)、トリプトン1%(BD社製)(w/v)、リン酸二水素カリウム0.5%(ナカライテスク社製)(w/v)、硫酸マグネシウム七水和物0.05%(w/v)(ナカライテスク社製)及び水からなる液体培地15mLを太試験管(22mm×200mm)に入れ、121℃、20分間オートクレーブした。冷却したこの液体培地に、(6)で取得した形質転換体を植菌し、30℃で4日間振とう培養した。培養終了後、遠心して上清を回収し、前述のGLD活性測定法に従い各々GLD活性(U/mL)を測定したところ、何れもGLD活性を確認でき、CiGLD遺伝子で形質転換した組換えカビは、培養液1mL当たり90U/mL、CiGLD-Atsig改変遺伝子で形質転換した組換えカビは、培養液1mL当たり250U/mLの生産性を確認できた。

[0107] [実施例11]

(N末端解析)

実施例1で得られた精製D u G L DのN末端を解析したところ、L S L T Y Dであることが明らかになった。つまり、M N H L L P A F A L A S L A V A S P Dの19アミノ酸がシグナル配列であり、該酵素は、翻訳後にシグナルペプチダーゼによる修飾で、該19アミノ酸が削除されており、配列番号8からなるグルコースデヒドロゲナーゼとして存在していることが分かった。更に、配列相同性や特許文献1記載のアスペルギルス・テレウスG L D配列との比較からO v G L D、B o t G L D及びC i G L Dも同様に19アミノ酸がシグナル配列と考えられた。

[0108] [実施例12]

(B o t r y t i s属微生物由来G L Dの精製：グルコースデヒドロゲナーゼ(E))

前培養培地(Dーグルコース1.0%、大豆粉2.0%、コーンステーパーリカー0.5%、硫酸マグネシウム七水和物0.1%、pH7.0)0.05Lを0.2L容バッフル付き三角フラスコに入れ、121℃、20分オートクレーブ処理し、これに予めプレート上で培養したB o t G L DーA t s i g改変遺伝子を導入したA. o r y z a e N S 4株を約0.5cm²接種し、25℃、100rpmで3日間回転振盪培養をした。これを種培養として、5Lジャーファーマンターに入れオートクレーブ処理した上記培地3.5Lに0.05L接種し、25℃、300rpm、1v/v/mで7日間培養した。培養終了後、培養液をろ布でろ過し、ろ液を回収した。次いで、得られたろ液を遠心分離(7,000×g、30分)により上清を回収し、メンブレンフィルター(10μm、アドバンテック社製)で吸引ろ過し、培養上清2Lを回収した。

[0109] 上記の培養上清を、分画分子量8,000の限外ろ過濃縮膜(ミリポア社製)を用いて濃縮し、濃縮後の酵素液に硫酸アンモニウムを50%飽和となるよう徐々に添加し、余分な蛋白質を沈殿させた。該酵素液を、一晩、4℃で放置後、遠心分離(7,000×g、30分)により上清を回収した。

[0110] この上清を緩衝液A1（20mMリン酸カリウム緩衝液、50%飽和硫酸アンモニウム、pH6.0）にて予め平衡化したブチルトヨパール650C（東ソー社製）カラム（ ϕ 2.0cm $\times$ 14.0cm）に通液し、緩衝液A1で該カラムを洗浄した後、緩衝液A1から緩衝液B1（20mMリン酸カリウム緩衝液、pH6.0）へのリニアグラジエントによってタンパクを溶出させた。溶出されたタンパクの内、活性画分を濃縮後、緩衝液C1（1mMリン酸カリウム緩衝液、pH6.0）で透析し、予め緩衝液C1で平衡化したDEAEセルファインA-500m（チッソ社製）カラムに通液した。緩衝液C1で該カラムを洗浄した後、緩衝液C1から緩衝液D1（200mMリン酸カリウム緩衝液、pH6.0）へのリニアグラジエントでタンパクを溶出させた。溶出されたタンパクの内、活性画分を濃縮・脱塩し、水置換した*Botrytis tulipae*由来GLDの精製酵素を得た。以降、*Botrytis tulipae*由来GLDの精製酵素をBotGLDと表記する。

[0111] [実施例13]

（*Ciborinia*属微生物由来GLDの精製：グルコースデヒドロゲナーゼ（F））

前培養培地（D-グルコース1.0%、大豆粉2.0%、コーンステーパーカー0.5%、硫酸マグネシウム七水和物0.1%、pH7.0）0.05Lを0.2L容バッフル付き三角フラスコに入れ、121℃、20分オートクレーブ処理し、これに予めプレート上で培養した*GiGLD-Atsig*改変遺伝子を導入した*A. oryzae* NS4株を約0.5cm²接種し、25℃、100rpmで3日間回転振盪培養をした。これを種培養として、5Lジャーファーマンターに入れオートクレーブ処理した上記培地3.5Lに0.05L接種し、25℃、300rpm、1v/v/mで7日間培養した。培養終了後、培養液をろ布でろ過し、ろ液を回収した。次いで、得られたろ液を遠心分離（7,000 $\times$ g、30分）により上清を回収し、メンブレンフィルター（10 μ m、アドバンテック社製）で吸引ろ過し、培養上

清 2 L を回収した。

[0112] 上記の培養上清を、分画分子量 8, 000 の限外ろ過濃縮膜（ミリポア社製）を用いて濃縮し、濃縮後の酵素液に硫酸アンモニウムを 50% 飽和となるよう徐々に添加し、余分な蛋白質を沈殿させた。該酵素液を、一晚、4℃で放置後、遠心分離（7, 000×g、30分）により上清を回収した。

[0113] この上清を緩衝液 A 1（20 mM リン酸カリウム緩衝液、50% 飽和硫酸アンモニウム、pH 6.0）にて予め平衡化したブチルトヨパール 650 C（東ソー社製）カラム（φ 2.0 cm × 14.0 cm）に通液し、緩衝液 A 1 で該カラムを洗浄した後、緩衝液 A 1 から緩衝液 B 1（20 mM リン酸カリウム緩衝液、pH 6.0）へのリニアグラジエントによってタンパクを溶出させた。溶出されたタンパクの内、活性画分を濃縮後、緩衝液 C 1（1 M リン酸カリウム緩衝液、pH 6.0）で透析し、予め緩衝液 C 1 で平衡化した DEAE セルファイン A-500 m（チッソ社製）カラムに通液した。緩衝液 C 1 で該カラムを洗浄した後、緩衝液 C 1 から緩衝液 D 1（200 mM リン酸カリウム緩衝液、pH 6.0）へのリニアグラジエントでタンパクを溶出させた。溶出されたタンパクの内、活性画分を濃縮・脱塩し、水置換した *Ciborinia* 属由来 GLD の精製酵素を得た。以降、*Ciborinia* 属由来 GLD の精製酵素を *CiGLD* と表記する。

[0114] [実施例 14]

（本発明の GLD の性質試験）

実施例 で得られた各精製 GLD の諸性質を調べた。（A）は *DuGLD*、（B）は *OvGLD*、（C）は *ScGLD*、（D）は *BoGLD*、（E）は *BotGLD*、（F）は *CiGLD* の酵素である。

（a）補酵素

（A）～（F）の各精製 GLD の 300-600 nm における吸収スペクトルを、プレートリーダー（SPECTRA MAX PLUS 384、モレキュラーデバイス社製）を用いて測定し、測定結果を図 1 に示した。各精製 GLD で、360-380 nm 付近及び 450-460 nm 付近に吸収

極大が認められた。これらの吸収極大はフラビンに特有であるため、本発明のGLDは、何れも補酵素がフラビンアデニンジヌクレオチドであることが明らかになった。

[0115] (b) D-グルコースに対する K_m 値

(A)～(F)の各精製GLDについて、前記活性測定法において、基質であるD-グルコース濃度を変化させて活性測定を行った。Hanes-Woolfプロットから各GLDのミカエリス定数(K_m)を求め、表1にまとめた。尚、 K_m 値は、測定方法や算出するプロットによって値が変動し易いため、DuGLDの K_m は約100～200mM、OvGLDの K_m は約10～40mM、ScGLDの K_m は約10～30mM、BoGLDの K_m は約20～50mM、BotGLDの K_m は約20～50mM、CiGLDの K_m は約1.0～20mMと考えられる。

[0116] [表1]

本発明のGLDの K_m 値

	K_m 値 (mM)
DuGLD	140
OvGLD	22.8
ScGLD	16.7
BoGLD	35.0
BotGLD	36.2
CiGLD	5.44

[0117] (c) グルコース酸化酵素(GOD)活性の測定

(A)～(F)の各精製GLDのGOD活性を調べた結果、何れのGLDについてもGOD活性は見られなかった。よって、本発明のGLDは酸素を電子受容体として実質的に利用しないため、血糖測定用バイオセンサに本発明のGLDを用いると溶存酸素の影響を受けにくいバイオセンサを作成できることが明らかになった。

[0118] GOD活性は、以下の方法で測定した。100mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)1.00mL、25mM 4-アミノアンチピリン0.10mL、420mMフェノール0.10mL、ペルオキシダーゼ(100u

i t s / m L) 0.10 mL、超純水 0.65 mL、D-グルコース 1.00 mL を混合し、37℃で5分間保温後、酵素サンプル 0.05 mL を添加し、反応を開始した。反応開始時から酵素反応の進行に伴う 500 nm における吸光度の1分間あたりの増加量 (ΔA_{500}) を測定し、式2に従い GOD 活性を算出した。この際 GOD 活性は、37℃、pH 7.0 で、1分間に $1 \mu\text{mol}$ の過酸化水素を生成する酵素量を 1 U と定義した。尚、式中の 3.0 は反応試薬+酵素溶液の液量 (mL)、10.66 は本測定条件におけるモル吸光係数 ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)、0.5 は1モルの過酸化水素の生成量に対するキノン型色素の生成量、1.0 はセルの光路長 (cm)、0.05 は酵素溶液の液量 (mL)、 $\Delta A_{500\text{blank}}$ は酵素の希釈に用いた溶液を酵素溶液の代わりに添加して反応開始した場合の 500 nm における吸光度の1分間あたりの増加量、df は希釈倍率を表す。

[0119] [数2]

$$\text{GOD 活性 (U/mL)} = \frac{(\Delta A_{500} - \Delta A_{500\text{blank}}) \times 3.0 \times \text{df}}{10.66 \times 0.5 \times 1.0 \times 0.05}$$

[0120] (d) 熱安定性

(A) ~ (D) の各精製 GLD を 6 U/mL に調製し、100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0) 中で、4 ~ 60℃ の各温度で 15 分間処理した後、前記酵素活性測定方法で酵素活性を測定した。酵素活性の残存率を算出し、熱安定性として図2に示した。各精製 GLD を 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0) 中で、4℃、15分間処理した後に、前記酵素活性測定法により測定した活性を 100% とした場合に、各温度で 15 分間処理した後に、前記酵素活性測定法により測定した残存活性が、DuGLD は 35℃ で 90% 以上、40℃ で 70% 以上、45℃ で 30% 以上、OvGLD は 35℃ で 90% 以上、40℃ で 80% 以上、45℃ で 30% 以上、ScGLD は 40℃ で 90% 以上、45℃ で 70% 以上、BoGLD は 35℃ で 90% 以上、40℃ で 80% 以上、45℃ で 15% 以上の残存活性だった。以上から、本発明の GLD は、40℃、15 分間の熱処理後に 70% 以上、

35℃、15分処理後に90%以上の残存活性を有していることがわかった。

[0121] (e) 安定pH

(A)～(F)の各精製GLDを6U/mLに調製し、終濃度が100mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH3.5～5.5、図中斜め四角印でプロット)、100mMクエン酸ナトリウム緩衝液(pH5.0～6.0、図中四角印でプロット)、100mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH5.0～6.0、図中黒丸印でプロット)、100mMリン酸カリウム緩衝液(pH6.0～7.5、図中三角印でプロット)、100mM Tris-HCl緩衝液(pH7.0～9.0、図中白丸印でプロット)、100mMグリシン-NaOH緩衝液(pH8.0～11.0、図中×でプロット)になるように緩衝液を添加し、25℃で16時間処理した後、前記酵素活性測定方法で酵素活性を測定した。酵素活性の残存率を算出し、安定pHとして図3に示した。その結果、各精製GLDを100mM各種pHの緩衝液で25℃、16時間処理した後に最も安定だったpHの緩衝液で処理した酵素の活性を100%とした場合に、DuGLDはpH4.4～7.2で80%以上、pH4.4～7.3で70%以上、pH4.1～8.1で40%以上、OvGLDはpH4.5～7.0で80%以上、pH3.9～7.8で70%以上、pH3.5～7.8で40%以上、ScGLDはpH5.0～7.9で80%以上、pH4.5～8.4で70%以上、pH4.0～9.1で40%以上、BoGLDはpH4.5～7.3で80%以上、pH4.1～7.3で70%以上、pH3.6～7.8で40%以上、BotGLDはpH5.0～7.5で80%以上、pH3.9～7.7で70%以上、pH3.3～7.8で40%以上、CiGLDはpH5.1～7.4で80%以上、pH3.9～7.9で70%以上、pH3.5～7.9で40%以上の残存活性だった。以上から、本発明のGLDの安定pH範囲は、pH5.0～7.0で80%以上、pH4.5～7.0で70%以上、pH4.0～7.5で40%以上であることがわかった。尚、同じpHであっても緩衝液の種類によって残存活性は

異なることがある。

[0122] (f) 分子量

DuGLD及びOvGLDを、0.2M NaClを含む50mMリン酸カリウム緩衝液(pH6.0)に溶解し、移動相に同緩衝液を使用してTSK Gel-G3000SW(ϕ 2.15cm×60.0cm、東ソー社製)にて分析した。ゲルろ過法による分析で測定した結果、分子量マーカー(Bio-Rad社製、Gel Filtration Standard)を指標にして、DuGLDの分子量は150~230kDa、OvGLDの分子量は260~440kDaだった。

[0123] (A)~(F)の各精製GLDの糖鎖切断前後の分子量を以下の方法で求めた。各酵素溶液(各1.0mg/mLに調製)5 μ Lと1%SDS及び2% β -メルカプトエタノールを含む0.4Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)5 μ Lを混合し、100℃で3分間熱処理を行った。糖鎖切断処理として、熱処理後のサンプルにエンドグリコシダーゼH(ロシュ製)を10 μ L(50mU)添加し、37℃で18時間反応させた。糖鎖切断処理前後のサンプルをe-パジェル7.5%(アトー社製)を用いたSDS-ポリアクリルアミド電気泳動に供し、泳動後にクマシー・ブリリアント・ブルー(CBBで)染色した。結果を図4に示した。各GLDと分子量マーカーの移動度を比較して分子量を求めた。泳動サンプルは以下の通りである。

図4 (A)

レーン1: 分子量マーカー (BioDynamics Laboratory社製 DynaMarker Protein Recombinant (10-150kDa)、上から150kDa、100kDa、80kDa、60kDa、40kDa)

レーン2: DuGLD糖鎖切断前

レーン3: DuGLD糖鎖切断後

図4 (B)

レーン1: 分子量マーカー (BioDynamics Laboratory

y社製 DynaMarker Protein Recombinant
(10-150 kDa)、上から150 kDa、100 kDa、80 kDa
、60 kDa、40 kDa)

レーン2 : OvGLD糖鎖切断前

レーン3 : OvGLD糖鎖切断後

図4 (C)

レーン1 : 分子量マーカー (BioDynamics Laboratory
社製 DynaMarker Protein Recombinant
(10-150 kDa)、上から150 kDa、100 kDa、80 kDa
、60 kDa、40 kDa)

レーン2 : ScGLD糖鎖切断前

レーン3 : ScGLD糖鎖切断後

図4 (D)

レーン1 : 分子量マーカー (BioDynamics Laboratory
社製 DynaMarker Protein Recombinant
(10-150 kDa)、上から150 kDa、100 kDa、80 kDa
、60 kDa、40 kDa)

レーン2 : BoGLD糖鎖切断前

レーン3 : BoGLD糖鎖切断後

図4 (E)

レーン1 : 分子量マーカー (BioDynamics Laboratory
社製 DynaMarker Protein Recombinant
(10-150 kDa)、上から150 kDa、100 kDa、80 kDa
、60 kDa、40 kDa)

レーン2 : BotGLD糖鎖切断前

レーン3 : BotGLD糖鎖切断後

図5 (F)

レーン1 : 分子量マーカー (BioDynamics Laboratory

y社製 DynaMarker Protein Recombinant (10-150 kDa)、上から150 kDa、100 kDa、80 kDa、60 kDa、40 kDa)

レーン2 : CiGLD糖鎖切断前

レーン3 : CiGLD糖鎖切断後

[0124] 図4より、DuGLDの分子量は90~130 kDa、OvGLDの分子量は130~200 kDa、ScGLDの分子量は70~90 kDa、BoGLDの分子量は90~100 kDa、BotGLDの分子量は100~120 kDa、CiGLDの分子量は900~1000 kDa、糖鎖切断後の分子量は、何れも60~70 kDaだった。

[0125] (g) 基質特異性

(A) ~ (F) の各精製GLDについて、前記酵素活性測定法におけるD-グルコースを他の基質に置き換え、各基質に対する酵素活性を測定した。各基質としては、マルトース、D-ガラクトース、D-フルクトース、ソルビトール、ラクトース、スクロース、D-キシロース、D-マンノース及びトレハロースを用いた。D-グルコースに対する活性を100%とした場合の各基質に対する相対活性を求め、基質特異性として表2にまとめた。

[0126] [表2]

基質	相対活性 (%)					
	DuGLD	OvGLD	ScGLD	BoGLD	BotGLD	CiGLD
D-グルコース	100	100	100	100	100	100
マルトース	0.54	3.0	3.9	1.1	1.5	6.4
D-ガラクトース	0.28	1.3	1.5	0.39	0.76	10
D-フルクトース	0.1>	0.12	0.1>	0.1>	0.1>	0.49
ソルビトール	0.1>	0.1>	0.1>	0.1>	0.1>	0.38
ラクトース	0.1>	0.1>	0.1>	0.1>	0.1>	0.21
スクロース	0.1>	0.1>	0.1>	0.1>	0.1>	0.40
D-キシロース	10	8.2	22	10	20	25
D-マンノース	1.7	5.7	11	3.9	8.2	23
トレハロース	1.0	4.6	7.8	2.7	10	20

[0127] 本発明のGLDは、基質濃度333 mMでの測定時に、D-グルコースに対する活性を100%とした場合に、マルトース、D-ガラクトース、D-フルクトース、ソルビトール、ラクトース及びスクロースに対する反応性が20%以下で、更にD-フルクトース、ソルビトール、ラクトース及びスク

コースに対する活性は1%以下だった。

[0128] (h) 至適温度

(A)～(D)の各精製GLDについて、前記酵素活性測定法における温度を5～60℃の各温度に設定し、更に基質の終濃度を10mM及び50mMとして酵素活性を測定した。基質の終濃度が10mMの場合、100mMリン酸カリウム緩衝液(pH6.0)1.00mL、1M D-グルコース溶液0.03mL、超純水1.58mL、3mM DCIP0.14mL及び3mM 1-m-PMS0.20mLを混合し、基質の終濃度が50mMの場合、100mMリン酸カリウム緩衝液(pH6.0)1.00mL、1M D-グルコース溶液0.15mL、超純水1.46mL、3mM DCIP0.14mL及び3mM 1-m-PMS0.20mLを混合し、何れの基質の終濃度の場合も37℃で保温する代わりに各温度で10分間保温し、酵素サンプル0.05mLを添加し、各温度にて反応を開始した。反応開始時から5分間、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を測定し、直線部分から前記式1に従いGLD活性を算出した。各精製GLDが最大活性を示す温度における活性値を100%とした場合の各温度における相対活性を求め、至適温度として図5に示した。その結果、各精製GLDが最大活性を示す温度における活性値を100%とした場合に、基質濃度10mMでは、DuGLDは30～45℃で80%以上、OvGLDは30～50℃で80%以上、ScGLDは30～50℃で80%以上、BoGLDは30～45℃で80%以上の相対活性で、基質濃度50mMでは、DuGLDは30～50℃で80%以上、OvGLDは35～55℃で80%以上、ScGLDは40～55℃で80%以上、BoGLDは30～45℃で80%以上の相対活性で、何れの基質濃度においても、DuGLDは30～45℃で80%以上、OvGLDは35～50℃で80%以上、ScGLDは40～50℃で80%以上、BoGLDは30～45℃で80%以上の相対活性であった。以上から、本発明のGLDは、最大活性を示す温度における活性値を100%とした場合に、基質濃度10mMでは3

0～45℃、基質濃度50mMでは40～45℃で相対活性値が80%以上であり、何れの基質の終濃度においても40～45℃で相対活性値が80%以上だった。

[0129] (i) 至適pH

(A)～(E)の各精製GLDについて、前記酵素活性測定法におけるリン酸カリウム緩衝液を各基質に置き換え、各pHにおける酵素活性を測定した。各緩衝液としては、酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0～5.5、図中四角印でプロット)、クエン酸ナトリウム緩衝液(pH5.0～6.0、図中斜め四角印でプロット)、リン酸カリウム緩衝液(pH6.0～7.5、図中三角印でプロット)、トリス・塩酸緩衝液(pH7.0～9.0、図中白丸印でプロット)及びグリシン・水酸化ナトリウム緩衝液(pH8.0～10.0、図中黒丸印でプロット)を用いた。各精製GLDが最大活性を示す温度における活性値を100%とした場合の各pHにおける相対活性を求め、至適pHとして図6に示した。その結果、各精製GLDが最大活性を示す緩衝液のpHにおける活性値を100%とした場合に、DuGLDはpH6.0～8.0で80%以上、pH5.0～9.0で40%以上、OvGLDはpH6.0～7.5で80%以上、pH5.0～9.0で40%以上、ScGLDはpH5.5～7.5で80%以上、pH5.0～9.5で40%以上、BoGLDはpH5.5～7.5で80%以上、pH5.0～9.0で40%以上、BotGLDはpH5.5～7.5で80%以上、pH5.0～9.0で40%以上だった。以上から、本発明のGLDは、最大活性を示す緩衝液のpHにおける活性値を100%とした場合に、pH6.0～7.5で相対活性値が80%以上、pH5.0～9.0で40%以上だった。

[0130] (j) 温度特性

(A)～(D)の各精製GLDについて、前記酵素活性測定法における温度を10～50℃の各温度に設定し、更に基質の終濃度を10mM及び50mMとして酵素活性を測定した。30、45℃における活性値を100%と

した場合の各温度の相対活性を求め、表3にまとめた。尚、同条件で1サンプルにつき2回ずつ測定し、平均した値について表にまとめた。その結果、30℃における活性値を100%とした場合に、10～50℃における活性値の範囲は、基質濃度10mMでは、DuGLDは60.6～108%、OvGLDは54.4～107%、ScGLDは43.2～119%、BoGLDは55.0～106%で、基質濃度50mMでは、DuGLDは56.0～111%、OvGLDは43.7～123%、ScGLDは41.6～141%、BoGLDは49.5～112%だった。30℃における活性値を100%とした場合に、10～45℃における活性値の範囲は、基質濃度10mMでは、DuGLDは60.6～108%、OvGLDは54.4～107%、ScGLDは43.2～119%、BoGLDは55.0～106%で、基質濃度50mMでは、DuGLDは56.0～111%、OvGLDは43.7～123%、ScGLDは41.6～137%、BoGLDは49.5～112%だった。45℃における活性値を100%とした場合に、10～45℃における活性値の範囲は、基質濃度10mMでは、DuGLDは60.1～107%、OvGLDは51.9～102%、ScGLDは36.4～100%、BoGLDは58.8～113%で、基質濃度50mMでは、DuGLDは50.5～100%、OvGLDは35.4～100%、ScGLDは30.5～100%、BoGLDは48.6～110%だった。以上から、本発明のGLDは、30℃における活性値を100%とした場合に、10～50℃における活性値の範囲が20～150%であることがわかった。よって、広い温度範囲で活性の変動が少ない。

[0131]

[表3]

(1) 30℃を100%とした場合

温度 (℃)	相対活性 (%)								
	DuGLD			OvGLD			ScGLD		
	10mM	50mM	10mM	10mM	50mM	10mM	10mM	50mM	BoGLD
10	60.6%	56.0%	54.4%	43.7%	43.7%	43.2%	41.6%	55.0%	49.5%
20	81.5%	77.9%	77.6%	72.2%	72.2%	71.5%	63.6%	74.9%	73.6%
30	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
40	108%	109%	107%	121%	121%	116%	127%	106%	112%
45	101%	111%	105%	123%	123%	119%	137%	93.5%	102%
50	87.5%	105%	97.8%	118%	118%	106%	141%	43.6%	62.0%

(2) 45℃を100%とした場合

温度 (℃)	相対活性 (%)								
	DuGLD			OvGLD			ScGLD		
	10mM	50mM	10mM	10mM	50mM	10mM	10mM	50mM	BoGLD
10	60.1%	50.5%	51.9%	35.4%	35.4%	36.4%	30.5%	58.8%	48.6%
20	80.7%	70.3%	74.0%	58.5%	58.5%	60.2%	46.6%	80.1%	72.3%
30	99.1%	90.2%	95.3%	81.0%	81.0%	84.3%	73.3%	107%	98.3%
40	107%	98.6%	102%	97.6%	97.6%	97.9%	93.1%	113%	110%
45	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
50	86.7%	94.4%	93.2%	95.7%	95.7%	89.7%	103%	46.6%	61.0%

[0132] (k) 1, 10-フェナントロリンによる阻害効果

(A) ～ (F) の各精製 G L D について、前記酵素活性測定法において、終濃度が 2 m M、5 m M、1 0 m M になるようにメタノールに溶解した 1, 1 0 - フェナントロリンをそれぞれ加えた場合の酵素活性を測定した。メタノールのみ添加の阻害効果を 0 % として、各濃度の 1, 1 0 - フェナントロリンの阻害効果を求め、1, 1 0 - フェナントロリンの阻害効果として表 4 にまとめた。

[0133] [表4]

1, 1 0 - フェナントロリン 終濃度 (mM)	阻害効果 (%)					
	D u G L D	O v G L D	S c G L D	B o G L D	B o t G L D	C i G L D
0	0	0	0	0	0	0
2	20.4	34.1	5.28	10.4	33.5	6.34
5	30.1	51.7	18.4	15.9	38.6	14.7
10	42.3	65.1	32.3	28.5	75.4	32.7

[0134] 本発明の G L D に対する 1, 1 0 - フェナントロリンの阻害効果は、2 m M では、D u G L D、O v G L D 及び B o t G L D は 2 0 ～ 3 4 %、S c G L D、B o G L D 及び C i G L D では 5 ～ 1 0 % 程度だった。

[0135] [実施例 1 5]

(本発明の G L D によるグルコースの定量)

(A) ～ (F) の本発明の G L D を用いて、前記活性測定法における D - グルコースの濃度を 0. 3 m M (5. 5 m g / d L) ～ 5 0 m M (9 0 0 m g / d L) の範囲に変化させて、吸光度変化を測定した。結果を図 7 に示した。本発明の G L D を用いて D - グルコースの定量が可能であることが示された。

[0136] [実施例 1 6]

本発明の各 G L D のアミノ酸配列同士又は塩基配列同士を G e n e D o c (2. 7. 0. 0) により比較して、各 i d e n t i t y % の数値を表 5 にまとめた。

[0137]

[表5]

アミノ酸配列		D.tuberosa	B.tulipae	B.tulipae	O.azaleae	O.azaleae	O.azaleae	C.camelliae	C.camelliae
		570AA	590AA	571AA	590AA	590AA	571AA	591AA	572AA
D.tuberosa	589AA	96%	84%	81%	83%	81%	81%	71%	69%
D.tuberosa	570AA		81%	84%	81%	93%	84%	69%	71%
B.tulipae	590AA			96%	93%	96%	96%	70%	68%
B.tulipae	571AA				96%		99%	68%	70%
O.azaleae	590AA						96%	70%	68%
O.azaleae	571AA							68%	70%
C.camelliae	591AA								96%

塩基配列		D.tuberosa	B.tulipae	B.tulipae	O.azaleae	O.azaleae	O.azaleae	C.camelliae	C.camelliae
		1713bp	1773bp	1716bp	1773bp	1773bp	1716bp	1776bp	1719bp
D.tuberosa	1770bp	96%	81%	78%	80%	78%	78%	73%	71%
D.tuberosa	1713bp		78%	81%	78%	80%	80%	71%	73%
B.tulipae	1773bp			96%	99%	96%	96%	70%	68%
B.tulipae	1716bp				96%		99%	68%	70%
O.azaleae	1773bp						96%	70%	68%
O.azaleae	1716bp							68%	70%
C.camelliae	1776bp								96%

[0138] 表5の結果より、本発明では、同一性が少なくとも60%のアミノ酸配列を有し、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質、及び同

一性が少なくとも60%の塩基配列であり、かつグルコースデヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチドを取得できたことが確認できた。

請求の範囲

- [請求項1] 下記の性質（１）～（３）を有するフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼ：
- （１）作用：電子受容体存在下でグルコース脱水素酵素活性を示す；
- （２）基質特異性：D-グルコースに対する活性値を１００％とした場合のマルトース、D-ガラクトース、D-フルクトース、ソルビトール、ラクトース及びスクロースに対する活性値が１０％以下である；
- （３）温度特性：３０℃における活性値を１００％とした場合に、１０～５０℃における活性値の範囲が２０～１５０％である。
- [請求項2] 酵素のポリペプチド部分の分子量が６０～７０kDaである請求項１記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。
- [請求項3] 至適温度が４０～４５℃である請求項１又は２記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。
- [請求項4] 下記の性質（６）及び（７）を有する請求項１～３のいずれか１項記載のフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼ：
- （６）至適pH：６．０～７．５；
- （７）安定pH範囲：４．５～７．０。
- [請求項5] ４０℃、１５分間の熱処理後の残存活性が７０％以上である請求項１～４のいずれか１項記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。
- [請求項6] 糸状菌由来である請求項１～５のいずれか１項記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。
- [請求項7] キンカクキン科に属する糸状菌由来である請求項１～６のいずれか１項記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。
- [請求項8] 以下の（a）、（b）又は（c）のアミノ酸配列を有し、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼ：
- （a）配列番号２、４、６、８、１０、１２、１４又は１６に示され

るアミノ酸配列、

(b) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14 又は 16 に示されるアミノ酸配列において、1 個～数個のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列、又は

(c) 配列番号 2 若しくは 10 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 90%、配列番号 4、6、12 若しくは 14 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 95%、又は配列番号 8 若しくは 16 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 70% の同一性を有するアミノ酸配列。

[請求項9] (d) 配列番号 10、12、14 又は 16 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 60% の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ以下の (i) ～ (v) の性質を有する精製されたフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼである：

- (i) グルコースの 1 位を酸化する、
- (i i) 実質的に酸素を電子受容体としない、
- (i i i) 安定 pH : 4.5 ～ 7.0、
- (i v) 糖タンパク質である、及び
- (v) 酵素のポリペプチド部分の分子量が 60 ～ 70 kDa。

[請求項10] 糸状菌又は酵母に属するグルコースデヒドロゲナーゼ生産菌を培養し、培養物からグルコースデヒドロゲナーゼを採取することを特徴とする請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項記載のグルコースデヒドロゲナーゼの製造法。

[請求項11] 被検試料と請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項記載のグルコースデヒドロゲナーゼを接触させる工程を含む該被検試料中のグルコースの測定方法。

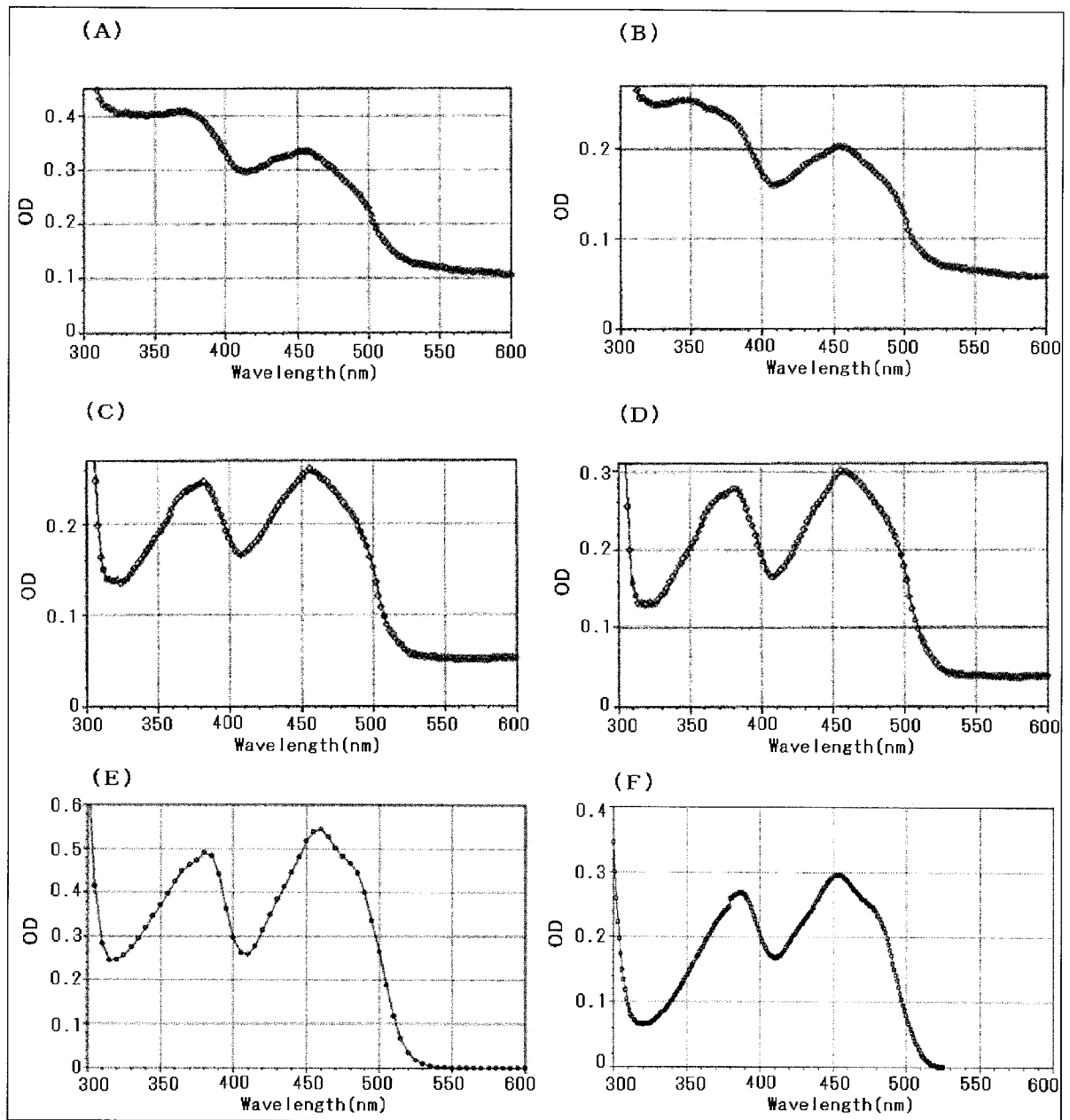
[請求項12] 測定時の pH が 5.0 ～ 9.0 であって、溶存酸素の影響を受けない請求項 11 に記載のグルコースの測定方法。

[請求項13] 請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項記載のグルコースデヒドロゲナーゼを含有するグルコース測定試薬。

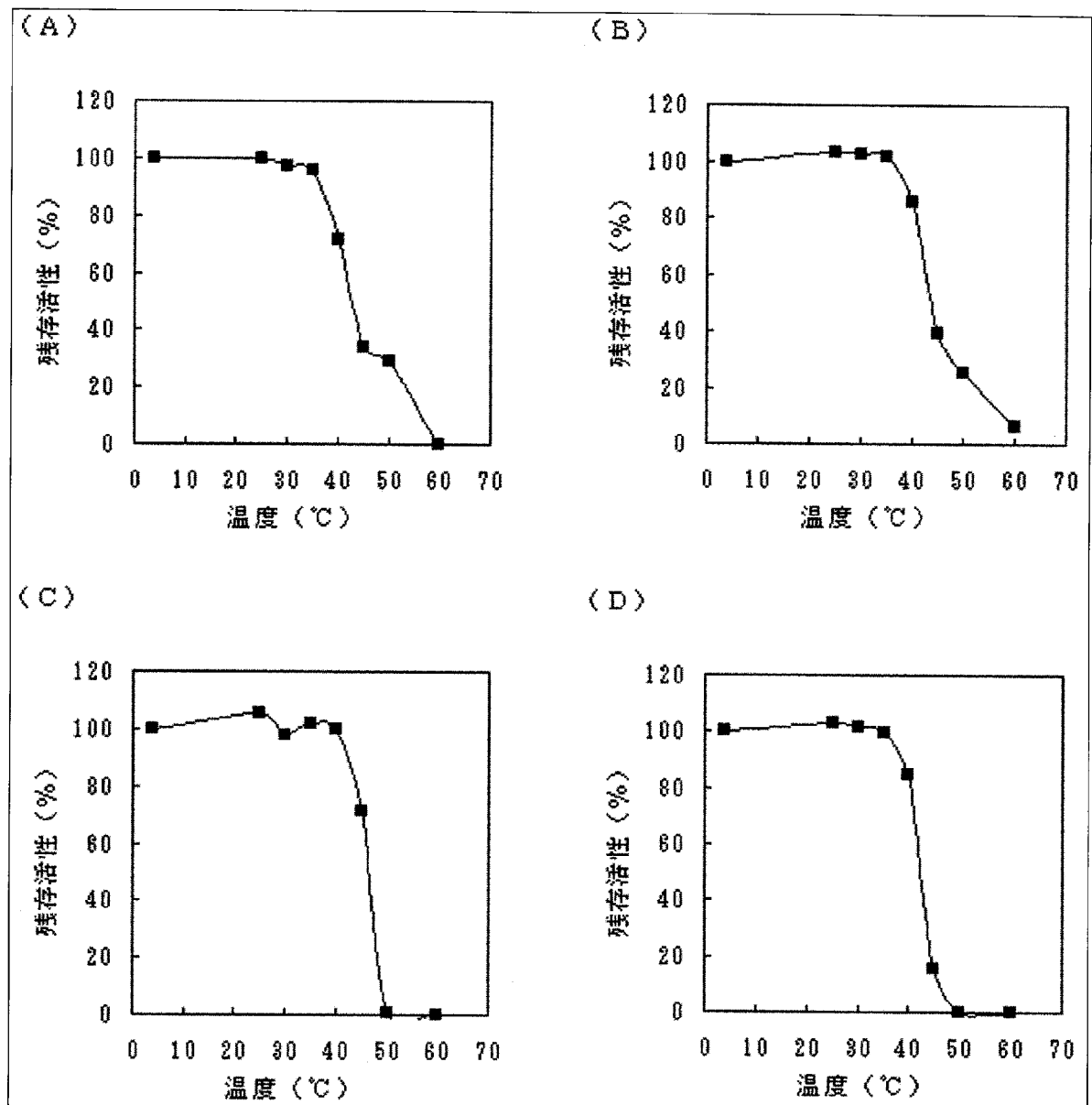
- [請求項14] pHが4.0～7.5である請求項14に記載のグルコース測定試薬。
- [請求項15] 請求項1～9のいずれか1項記載のグルコースデヒドロゲナーゼを含有するグルコース測定用バイオセンサ。
- [請求項16] 反応層のpHが4.0～7.5であって、溶存酸素の影響を受けない請求項16に記載のグルコース測定用バイオセンサ。
- [請求項17] 請求項8記載のグルコースデヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチド。
- [請求項18] 以下の(d)、(e)又は(f)のポリヌクレオチド：
 (d) 配列番号1、3、5、7、9、11、13又は15に示される塩基配列から成るポリヌクレオチド、
 (e) (d)のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつグルコースデヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチド、又は
 (f) 配列番号1若しくは9に示される塩基配列と少なくとも90%、配列番号3、5、11若しくは13に示される塩基配列と少なくとも95%、又は配列番号7若しくは15に示される塩基配列と少なくとも70%の同一性を有する塩基配列からなり、かつグルコースデヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチド。
- [請求項19] 配列番号9、11、13又は15に示される塩基配列と少なくとも60%の同一性を有する塩基配列からなり、開始コドンのAから57番目までの塩基を削除した改変遺伝子で、かつグルコースデヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチド。
- [請求項20] 請求項18又は19に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
- [請求項21] 請求項18若しくは19に記載のポリヌクレオチド、又は請求項20に記載のベクターを用いて作成された形質転換細胞。
- [請求項22] 糸状菌から調製された染色体DNA又はcDNAから、配列番号17及び18に記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いたP

C Rにより、グルコースデヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチドの一部を取得する工程を含む、グルコースデヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチドの製造方法。

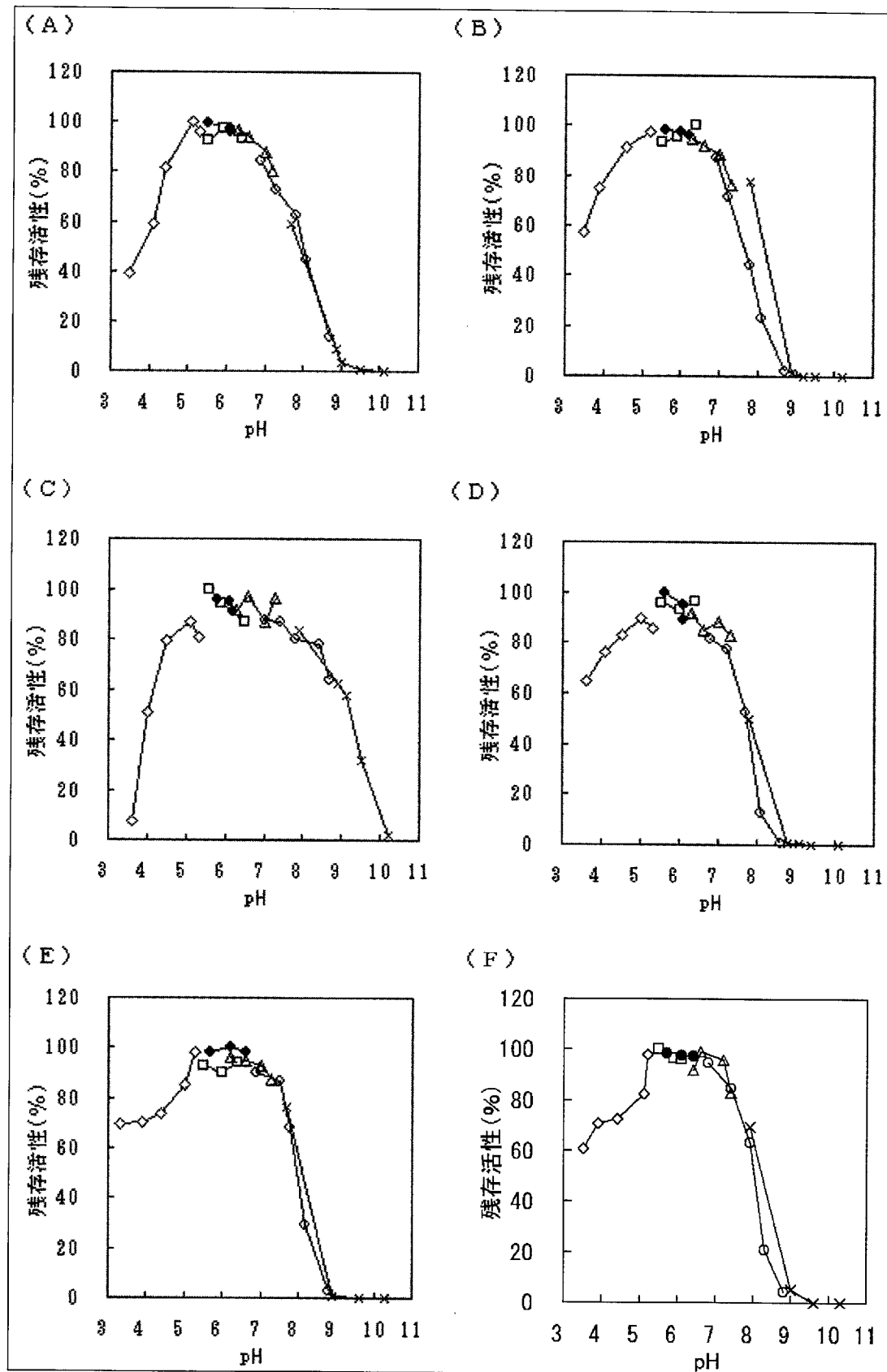
[図1]



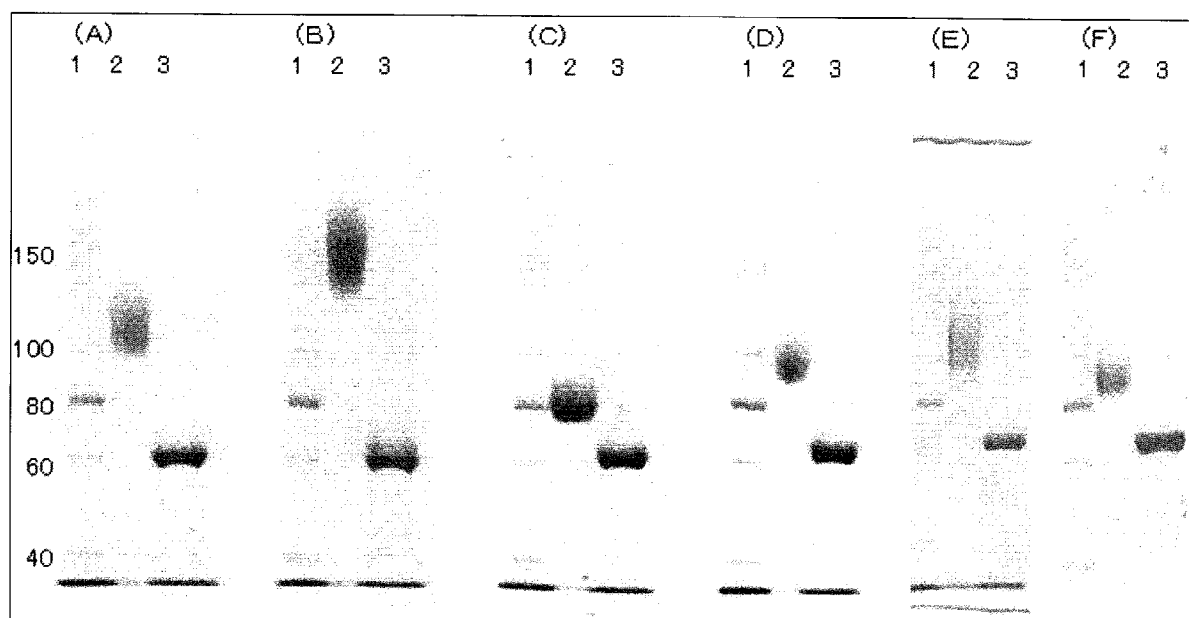
[図2]



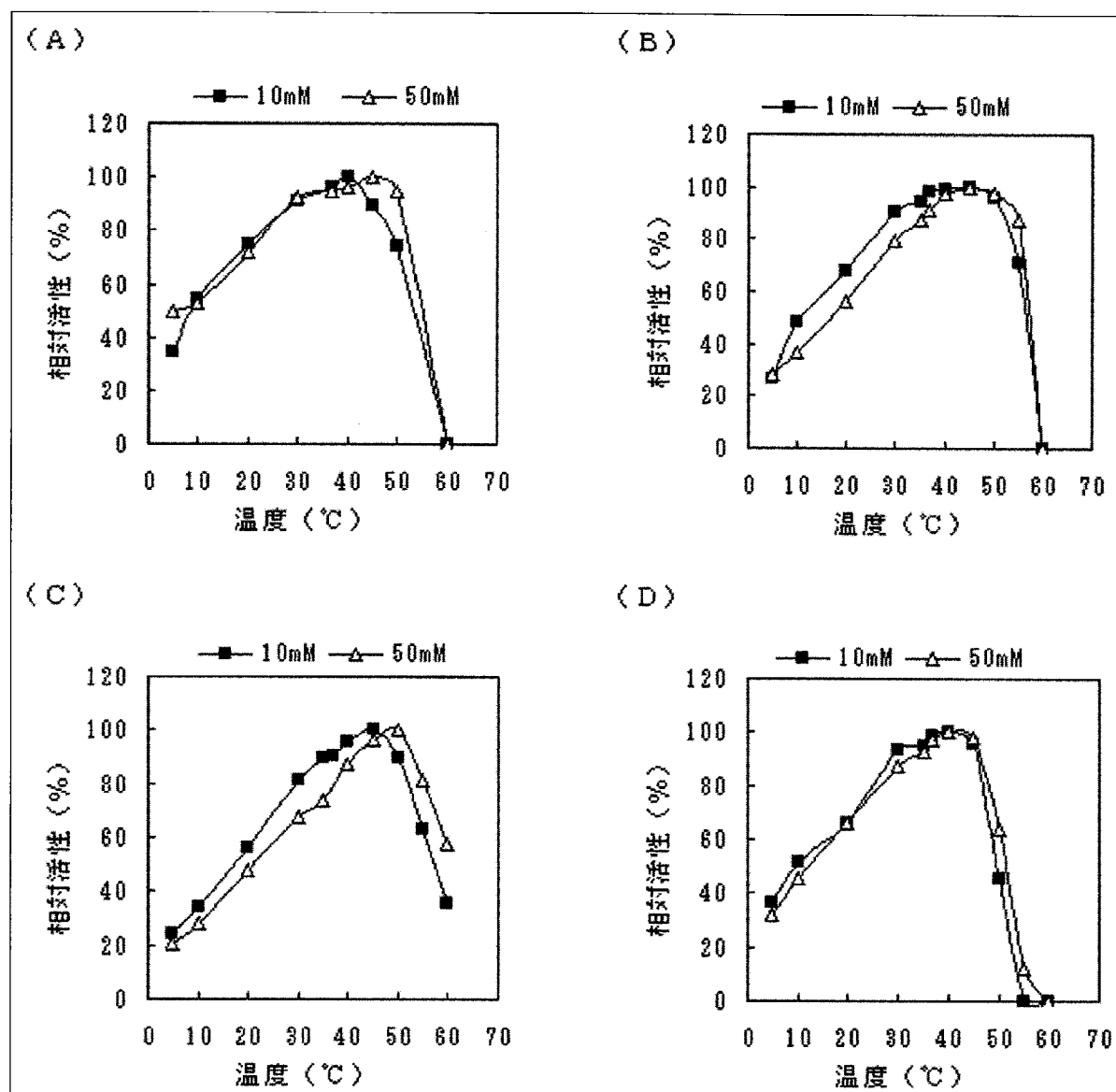
[図3]



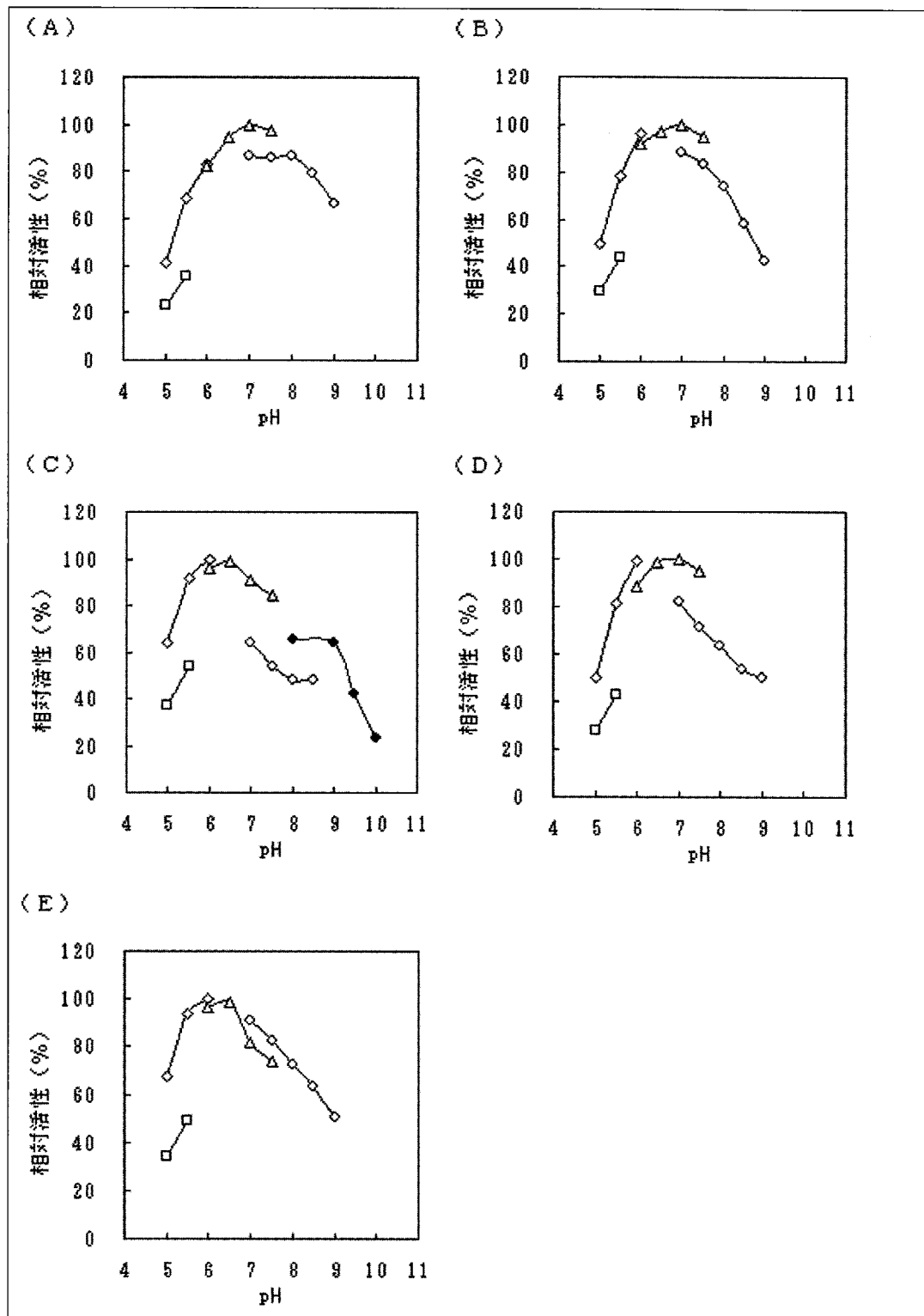
[図4]



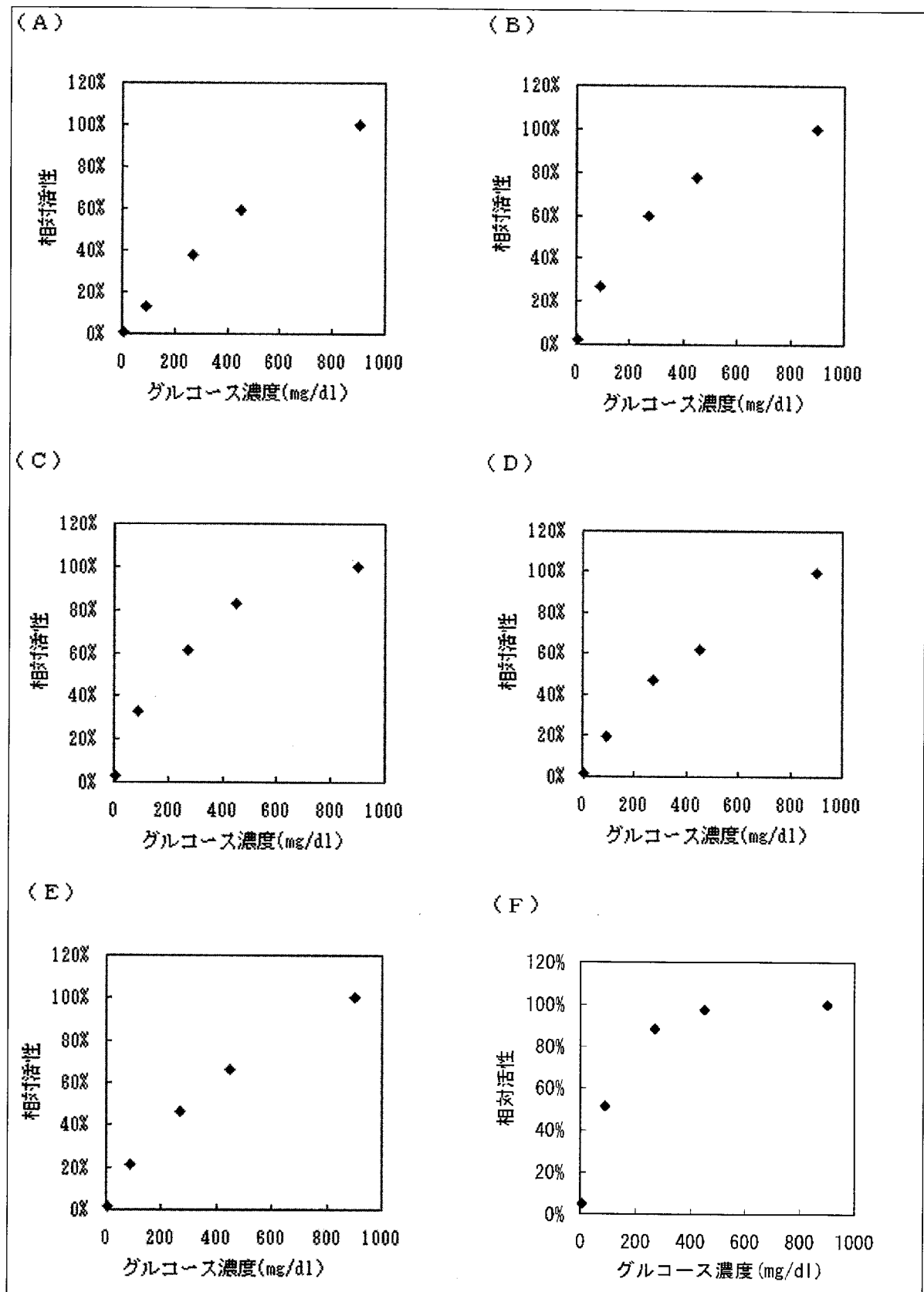
[図5]



[図6]



[図7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/071380

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N9/04(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/32(2006.01)i, C12Q1/54(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)

C12N9/04, C12M1/34, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/09, C12Q1/32, C12Q1/54

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	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

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

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Database GenBank [online] Accessin No.ED000423, 03-AUG-2007 uploaded, [retrieved on 2012-10-16], DEFINITION: hypothetical protein SS1G_14293 [Sclerotinia sclerotiorum 1980 UF-70], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/154700684>	8, 17 1-7, 9-16, 18-22
X Y A	Database GenBank [online] Accessin No.AJ555871, 05-JAN-2004 uploaded, [retrieved on 2012-10-16], DEFINITION: Botryotinia fuckeliana god1 gene for glucose oxidase, specimen voucher SAS 56, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AJ555871>	18 19-21 1-17, 22
Y A	Mol. Plant Pathol., Vol.5, No.1 (2004), p.17-27, particularly, page 18, right column, lines 23 to 25	19-21 1-18, 22



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
18 October, 2012 (18.10.12)

Date of mailing of the international search report
30 October, 2012 (30.10.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/071380

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	JP 2010-057427 A (Toyobo Co., Ltd.), 18 March 2010 (18.03.2010), particularly, claims; paragraph [0042] (Family: none)	22 1-21
Y A	WO 2008/001903 A1 (Ikeda Food Research Co., Ltd.), 03 January 2008 (03.01.2008), particularly, claims 9 to 16 & US 2011/0033880 A1	22 1-21
Y A	WO 2006/101239 A1 (Ikeda Food Research Co., Ltd.), 28 September 2006 (28.09.2006), particularly, claims 1 to 14 & US 2012/0122130 A1 & EP 1862543 A1 & CN 101160397 A	22 1-21
P,X P,A	WO 2012/001976 A1 (Ultizyme International Ltd.), 05 January 2012 (05.01.2012), particularly, claim 7; sequence no.7 (Family: none)	8-21 1-7,22

Subject to be covered by this search:

The explanation about the sequence ID numbers mentioned in the description and the contents of the sequences actually shown in the Sequence Listing disagree with each other.

For example, in paragraph [0035] in the description, it is described that SEQ ID NOs: 1 and 9 are nucleotide sequences for glucose dehydrogenase (GLD) gene originated from *Dumontinia*, SEQ ID NOs: 2 and 10 are amino acid sequences for GLD originated from *Dumontinia*, SEQ ID NOs: 3 and 11 are nucleotide sequences for GLD gene originated from *Botrytis*, SEQ ID NOs: 4 and 12 are amino acid sequences for GLD originated from *Botrytis*, SEQ ID NOs: 5 and 13 are nucleotide sequences for GLD gene originated from *Ovulinia*, SEQ ID NOs: 6 and 14 are amino acid sequences for GLD originated from *Ovulinia*, SEQ ID NOs: 7 and 15 are nucleotide sequences for GLD gene originated from *Ciborinia*, and SEQ ID NOs: 8 and 16 are amino acid sequences for GLD originated from *Ciborinia*.

However, the contents specifically disclosed in the Sequence Listing are as mentioned below, and therefore the nucleotide sequence or amino acid sequence for GLD originated from *Ciborinia* is not disclosed in any way.

SEQ ID NOs: 1 and 7: the nucleotide sequences for GLD gene originated from *Dumontinia*, SEQ ID NOs: 2 and 8: the amino acid sequences for GLD originated from *Dumontinia*, SEQ ID NOs: 3 and 9: the nucleotide sequences for GLD gene originated from *Botrytis*, SEQ ID NOs: 4 and 10: the amino acid sequences for GLD originated from *Botrytis*, SEQ ID NOs: 5 and 11: the nucleotide sequences for GLD gene originated from *Ovulinia*, SEQ ID NOs: 6 and 12: the amino acid sequence for GLD originated from *Ovulinia*, and SEQ ID NOs: 13-16: the nucleotide sequences for primers.

Therefore, a part of the flavin-binding glucose dehydrogenase described in claims 8 and 9 which relates to the "amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 14 or 16", a part of the polynucleotide described in claims 18 and 19 which relates to the "nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 13 or 15" and encoding the flavin-binding glucose dehydrogenase, and parts which refer to the above-mentioned parts are not supported satisfactorily, and no meaningful opinion could be expressed on these parts.

Further, with respect to SEQ ID NOs: 17 and 18, the sequences shown in paragraph [0081] in the description and the sequences shown in the Sequence Listing disagree with each other.

Then, with respect to the inventions in which the "oligonucleotides represented by SEQ ID NOs: 17 and 18" described in claim 22 are used as primers, the search was carried out with the understanding that the oligonucleotides are sequences described in paragraph [0081] in the description (i.e., SEQ ID NOs: 13 and 14 in the Sequence Listing).

Such being the case, the search with respect to the inventions described in claims 8, 9, 18, 19 and 22 which are specified by the SEQ ID NOs and the inventions referring to these inventions was carried out only on parts which are disclosed in and supported by the description, i.e., GLD originated from *Dumontinia*, GLD originated from *Botrytis* and GLD originated from *Ovulinia* (i.e., SEQ ID NOs: 1-12 shown in the Sequence Listing) and SEQ ID NOs: 13 and 14 shown in the Sequence Listing.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N9/04(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/32(2006.01)i, C12Q1/54(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 (I P C))

Int.Cl. C12N9/04, C12M1/34, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/09, C12Q1/32, C12Q1/54

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 2 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 2 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 2 年

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

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X A	Database GenBank [online] Accessin No.ED000423, 03-AUG-2007 uploaded, [retrieved on 2012-10-16], DEFINITION: hypothetical protein SSIG_14293 [Sclerotinia sclerotiorum 1980 UF-70], < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/154700684 >	8, 17 1-7, 9-16, 18-22
X Y A	Database GenBank [online] Accessin No.AJ555871, 05-JAN-2004 uploaded, [retrieved on 2012-10-16], DEFINITION: Botryotinia fuckeliana godl gene for glucose oxidase, specimen voucher SAS 56, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AJ555871 >	18 19-21 1-17, 22

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

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

の日の後に公表された文献

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

国際調査を完了した日

1 8 . 1 0 . 2 0 1 2

国際調査報告の発送日

3 0 . 1 0 . 2 0 1 2

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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)

吉田 知美

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

4 B

3 3 3 5

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
Y A	Mol. Plant Pathol., Vol. 5, No. 1 (2004), p. 17-27, 特に、18 頁右欄 23-25 行	19-21 1-18, 22
Y A	JP 2010-057427 A (東洋紡績株式会社) 2010. 03. 18, 特に、請求項、[0042] (ファミリーなし)	22 1-21
Y A	WO 2008/001903 A1 (池田食研株式会社) 2008. 01. 03, 特に、請求項 9 - 1 6 & US 2011/0033880 A1	22 1-21
Y A	WO 2006/101239 A1 (池田食研株式会社) 2006. 09. 28, 特に、請求項 1 - 1 4 & US 2012/0122130 A1 & EP 1862543 A1 & CN 101160397 A	22 1-21
P X P A	WO 2012/001976 A1 (有限会社アルティザイム・インターナショナル) 2012. 01. 05, 特に、請求項 7、配列番号 7 (ファミリーなし)	8-21 1-7, 22

<調査の対象について>

明細書本文中に記載された配列番号の説明と、配列表に実際に記載されている配列の内容が相違している。

例えば、明細書段落[0035]には、
配列番号1及び9はDumontinia由来のグルコースデヒドロゲナーゼ(GLD)遺伝子の塩基配列、
配列番号2及び10はDumontinia由来のGLDのアミノ酸配列であり、
配列番号3及び11はBotrytis由来のGLD遺伝子の塩基配列、
配列番号4及び12はBotrytis由来のGLDのアミノ酸配列であり、
配列番号5及び13はOvulinia由来のGLD遺伝子の塩基配列、
配列番号6及び14はOvulinia由来のGLDのアミノ酸配列であり、
配列番号7及び15はCiborinia由来のGLD遺伝子の塩基配列、
配列番号8及び16はCiborinia由来のGLDのアミノ酸配列である、と説明されている。

しかしながら、配列表に具体的に開示されている内容は以下のとおりであり、Ciborinia由来のGLDについては塩基配列もアミノ酸配列も何ら開示されていない。
配列番号1及び7：Dumontinia由来のGLD遺伝子の塩基配列、
配列番号2及び8：Dumontinia由来のGLDのアミノ酸配列、
配列番号3及び9：Botrytis由来のGLD遺伝子の塩基配列、
配列番号4及び10：Botrytis由来のGLDのアミノ酸配列、
配列番号5及び11：Ovulinia由来のGLD遺伝子の塩基配列、
配列番号6及び12：Ovulinia由来のGLDのアミノ酸配列、
配列番号13～16：プライマーの塩基配列。

したがって、請求項8及び9に係るフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼであって「配列番号14又は16に示されるアミノ酸配列」に関する部分、請求項18及び19に係るポリヌクレオチドであって、フラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼをコードする「配列番号13又は15に示される塩基配列」に関する部分、並びにこれらを引用する部分については、十分に裏付けられていないため、有意義な見解を示すことができなかった。

また、配列番号17及び18についても、明細書の段落[0081]に記載の配列と、配列表に記載の配列が異なっている。

そこで、請求項22に係る「配列番号17及び18に記載のオリゴヌクレオチド」をプライマーとして用いる発明については、明細書の段落[0081]に記載の配列（配列表においては、配列番号13及び14）で調査を行った。

よって、配列番号により特定されている請求項8、9、18、19、22及びこれらを引用する発明についての調査は、明細書に開示され、裏付けられている部分、すなわちDumontinia由来のGLD、Botrytis由来のGLD、及びOvulinia由来のGLD（配列表における配列番号1～12）、並びに、配列表における配列番号13及び14についてのみ行った。