

(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  
2018年4月26日(26.04.2018)



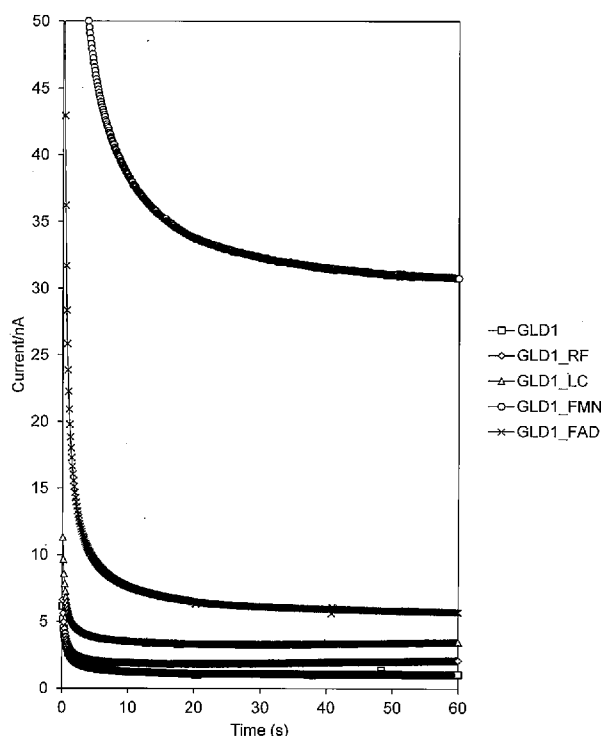
(10) 国際公開番号

WO 2018/074551 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12Q 1/26 (2006.01) G01N 27/327 (2006.01)  
C12M 1/34 (2006.01) H01M 4/90 (2006.01)  
C12Q 1/32 (2006.01) H01M 8/16 (2006.01)  
C12Q 1/54 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/037851
- (22) 国際出願日: 2017年10月19日(19.10.2017)
- (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 2016-205539 2016年10月19日(19.10.2016) 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: 銭 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).
- (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,

(54) Title: GLUCOSE REDOX REACTION USING FLAVIN COMPOUND AND COMPOSITION FOR GLUCOSE MEASUREMENT

(54) 発明の名称: フラビン化合物を用いたグルコース酸化還元反応及びグルコース測定用組成物



(57) Abstract: The objective of the present invention is to provide: an improved electrochemical measurement method for glucose; and an improved composition for glucose measurement. The present invention provides a composition for glucose measurement, which contains a flavin compound. The present invention also provides: an electrode which contains a flavin compound; a sensor which comprises this electrode; and a glucose fuel cell. The present invention additionally provides: an electrochemical measurement method for glucose, which uses a flavin compound; and a power generation method. A flavin compound according to the present invention has no or low toxicity and is thus applicable to, for example, implantation type continuous glucose measurement.

(57) 要約: 改良されたグルコースの電気化学的測定方法及びグルコース測定用組成物を提供すること。本発明は、フラビン化合物を含むグルコース測定用組成物を提供する。また本発明はフラビン化合物を含む電極を提供し、また、そのような電極を有するセンサー及びグルコース燃料電池を提供する。さらに本発明は、フラビン化合物を用いるグルコースの電気化学的測定方法、及び発電方法を提供する。本発明のフラビン化合物は毒性がないか又は低く、例えば体内埋め込み型の連続グルコース測定に用いることができる。

HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, 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,  
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, 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))

## 明 細 書

発明の名称：

フラビン化合物を用いたグルコース酸化還元反応及びグルコース測定用組成物

### 技術分野

[0001] 本発明は、フラビン化合物を用いたグルコース酸化還元反応及びフラビン化合物を含む組成物に関する。より詳細には、本発明は、グルコースオキシダーゼやグルコースデヒドロゲナーゼのメディエーターとしてフラビン化合物を用いるグルコース測定法に関する。また本発明は、糖尿病の診断試薬として、グルコースセンサーとして、また、グルコース測定キットに有利に利用され得るフラビン化合物を含むグルコース測定用組成物に関する。

### 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、G O Dともいう）やグルコースデヒドロゲナーゼ（以下、G D Hともいう）が用いられる。これらは家庭で利用できる血中グルコース濃度の自己測定（S M B G）装置や、持続血糖測定（C G M又はF G Mともいう）装置に用いられている。

[0003] グルコースオキシダーゼは $\beta$ -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（F A D）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G D H、ニコチンアミドジヌクレオチドリノ酸依存性G D H、ピロロキノリンキノン（P Q Q）依存性G D H、F A D依存性G D H（フラビン結合型G D H）等が挙げられる。

[0005] グルコース測定にGODを用いる際、過酸化水素電極を使用することができる。この方法では、過酸化水素電極に+0.6V (vs. Ag/AgCl) ~ +0.9V (vs. Ag/AgCl) の電圧を印加して、グルコースからグルコノラクトンが生じる際に生成する過酸化水素を測定する。この方法は主としてSMBGやCGMに用いられている。しかしながらこの方法は比較的高い電圧を印加するため、測定溶液に含まれるアスコルビン酸などの夾雑物質の影響を受けるという問題があった。

[0006] そこで過酸化水素に代えて人工電子メディエーター（以下、単にメディエーターともいう）を用いる方法が開発された。この方法では、酵素的にグルコースがグルコノラクトンへと変換される際に、酸化型メディエーターが還元型となる。そして還元型メディエーターが電極に電子を受け渡し、酸化型に戻る。メディエーターを用いる方法の利点として印加電圧を過酸化水素電極の場合と比較して低くすることができる。しかし、従来のメディエーターは高価であったり毒性であるという問題があった。例えば典型的なメディエーターであるフェリシアン化カリウム等の金属錯体はヒトの体内に入ると有害である。

[0007] その他の従来のメディエーターとしては、キノン類、フェナジン類、ピオロゲン類、シトクロム類、フェノキサジン類、フェノチアジン類、フェリシアン化物、例えばフェリシアン化カリウム、フェレドキシン類、フェロセンまたはフェロセン誘導体、オスミウム錯体などが知られていた。

[0008] GODやGDHは、補因子FADが酵素分子の内部に埋没していることが多いため、これらをグルコース測定に用いる場合には通常、メディエーターが存在しないと電極へと電子を受け渡すことができない。ところがメディエーターは高価であり、また、電極表面に固定化するのが困難である。例えば糖尿病患者のグルコース測定において、メディエーターを電極に固定化せずにCGM機器やFGM機器に用いようとする、測定溶液中に存在するメディエーターが体内へ流入する可能性があるが、メディエーターは多くの場合、生体適合性を有しない又は毒性であり、これが体内へ流入することは望ま

しくない。そのため、従来のメディエーターを用いるグルコース測定法はC GMやF GMの機器には向いておらず、メディエータが体内へ流入しないような工夫が別途必要となる。

[0009] 特許文献1は、試薬の保存期間の前後で電流値の変化が抑制されるメディエーター化合物を記載している。

特許文献2は酸化還元酵素を用いたバイオセンサを記載している。メディエーター化合物としてはフェロシアン化合物等が用いられている。

特許文献3は電子移動剤を用いる酸化還元反応を記載している。

[0010] 燃料電池への関心が高まっているが、従来の燃料電池は白金を使用することが多く、また電子伝達メディエーターとしてオスミウム錯体等の人工化合物が使用されることが多かった。白金は高価であり、また人工化合物は毒性であるなど廃棄処理コストを伴う。そのような中で、白金の代わりに酵素電極を用いた燃料電池が報告されている（例えば特許文献4）。特許文献4で使用されているメディエーターは金属錯体である。

[0011] FAD依存性GDH（フラビン結合型GDH）は、それをコードするmRNAからポリペプチドが合成されフォールディングする際、FAD結合部位にFADが取り込まれることが知られている。したがって活性を有するFAD依存性GDHはFADと非共有結合的に結合している（ホロ酵素）。また、FADと結合していないFAD依存性GDHは安定に存在しないことが知られている（アポ酵素）。一方、NAD依存性GDHは、アポ酵素としても存在でき、活性を示すにはNADを外部から添加する必要がある。FAD依存性GDHは、一般に、タンパク質発現時にFAD結合部位にFADが取り込まれることが知られている。ただし、一部、アポ型として存在するものもあり得る。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0012] 特許文献1：国際公開第2012/042903号

特許文献2：特表2007-509355号（特許第4839219号）

特許文献3：特開平 1－3 1 7 4 2 5 号（特許第 3 0 7 1 7 9 0 号）

特許文献4：特開 2 0 0 8－7 1 5 8 4 号

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

- [0013] ある実施形態において本発明は、上記の問題を解消しうる、グルコースの電気化学的測定方法及びグルコース測定用組成物を提供することを課題とする。別の実施形態において本発明は、改良されたグルコース燃料電池及び発電方法を提供することを課題とする。

### 課題を解決するための手段

- [0014] 本発明者は、上記の課題を解決するために鋭意努力した結果、フラビン化合物が、酵素により触媒されるグルコースの酸化還元反応に関し、驚くべきことにメディエーターとして機能しうることを見出し、本発明を完成させた。
- [0015] 特定の理論に拘束されることを望むものではないが、化合物にはそれぞれ固有の酸化還元電位があり、一般的には遊離型のフラビン化合物の酸化還元電位の方が、フラボタンパク質中のフラビン化合物の酸化還元電位よりもマイナス側にある（酸化還元電位が低い）。例えば遊離型 FAD の酸化還元電位（ $-0.219\text{ V (vs. NHE)}$ ）はフラボタンパク質中の FAD の酸化還元電位（ $\sim 0\text{ V (vs. NHE)}$ ）よりも低電位側にある（ヴォート生化学（上）第2版、第15章参照）。このような場合、理論上、酸化還元電位の高い化合物から低い化合物へと電子が移動することはないと考えられる。ところが本発明において、フラボタンパク質と遊離型のフラビン化合物とを混合した系について電気化学的測定を行ったところ、電流が観察された。これは上記に鑑みれば驚くべき知見である。
- [0016] 本発明は以下を包含する。
- [1] 遊離型のフラビン化合物を含み、精製された FAD 依存性グルコースオキシダーゼ又は精製された FAD 依存性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、

ただし該組成物は、

(i) 外部から添加される、単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることのできる、人工電子メディエーターを含まない、

(ii) 外部から添加される、単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることのできる、非水溶性の電子メディエーターを含まない、又は

(iii) 外部から添加される、単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることのできる、酸化還元電位が0.3V以上の電子メディエーターを含まない、

前記グルコース測定用組成物。

[2] 遊離型のフラビン化合物を含み、精製されたFAD依存性グルコースオキシダーゼ又は精製されたFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼを含む、アノード電極、

ただし該電極は、

(i) 外部から添加される、単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることのできる、人工電子メディエーターを含まない、

(ii) 外部から添加される、単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることのできる、非水溶性の電子メディエーターを含まない、又は

(iii) 外部から添加される、単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることのできる、酸化還元電位が0.3V以上の電子メディエーターを含まない、

前記アノード電極。

[3] 2に記載のアノード電極、カソード電極、及び、グルコースを含む燃料槽を有する、グルコース燃料電池。

[4] 遊離型のフラビン化合物及び、精製されたFAD依存性グルコースオ

キシダーゼ又は精製されたFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼを有する、グルコースセンサー、

ただし該センサーは、

- (i) 外部から添加される、人工電子メディエーターを含まない、
- (ii) 外部から添加される、非水溶性の電子メディエーターを含まない、又は
- (iii) 外部から添加される、酸化還元電位が0.3V以上の電子メディエーターを含まない、

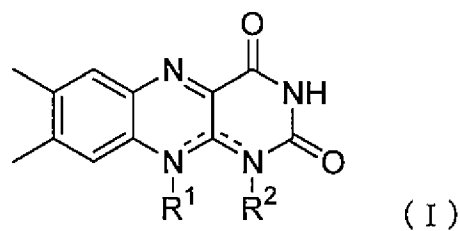
前記センサー。

[5] 該フラビン化合物が固相中に固定化されている非酵素型のフラビン化合物である、2に記載の電極、3に記載の電池又は4に記載のセンサー。

[6] 精製されたFAD依存性グルコースオキシダーゼ又は精製されたFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼが固相中に固定化されている、2又は5に記載の電極、3又は5に記載の電池或いは4又は5に記載のセンサー。

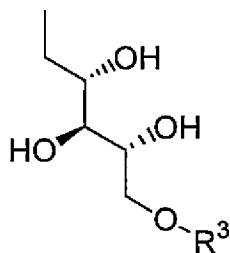
[7] フラビン化合物が以下の化学式(1)

[化1]



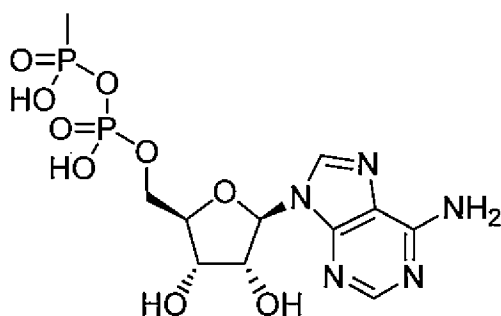
[式中、R<sup>1</sup>は存在しないか又は-CH<sub>3</sub>、若しくは

[化2]



であり、 $R^1$ が存在しない場合には、 $R^1$ が連結して描かれている窒素原子は隣接炭素原子との間に二重結合を形成しておりかつ $R^2$ はHであり、 $R^2$ は存在しないか、又はHであり、 $R^2$ が存在しない場合には、 $R^2$ が連結して描かれている窒素原子は隣接炭素原子との間に二重結合を形成しており、 $R^3$ は、H、リン酸基、又は

[化3]



である]

で表される化合物である、1に記載の組成物、2、5若しくは6に記載の電極、3、5若しくは6に記載の電池又は4、5若しくは6に記載のセンサー。

[8] フラビン化合物が、フラビンモノヌクレオチド、リボフラビン、ルミクロム、フラビンアデニンジヌクレオチド又はルミフラビンである、1若しくは7に記載の組成物、2、5、6若しくは7に記載の電極、3、5、6若しくは7に記載の電池又は4、5、6若しくは7に記載のセンサー。

[9] 前記(i)において、人工電子メディエーターが、キノン類、フェナジン類、ビオロゲン類、シトクロム類、チオレドキシン類、フェノキサジン類、フェノチアジン類、フェリシアン化物、フェレドキシン類、フェロセン、フェロセン誘導体、及び金属錯体である、

前記(ii)において、非水溶性の電子メディエーターがフェロセン、非水溶性のキノン類、非水溶性のフェナジン類、非水溶性のビオロゲン類、非水溶性のチオレドキシン類、非水溶性のフェノキサジン類、非水溶性のフェノチアジン類、非水溶性のフェレドキシン類、及び非水溶性のフェロセン誘導体

である、又は

前記(iii)において、さらに、酸化還元電位が0.2 V以上の電子メディエーターを含まない、

1、7若しくは8に記載の組成物、2、5、6、7若しくは8に記載の電極、3、5、6、7若しくは8に記載の電池又は4、5、6、7若しくは8に記載のセンサー。

[10] グルコースを含みうる試料と、遊離型のフラビン化合物と、精製されたFAD依存性グルコースオキシダーゼ又は精製されたFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼとを接触させる工程、及び電流を測定する工程を含む、グルコースの電気化学的測定方法、

ただし該方法は、

(i) 単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることのできる人工電子メディエーターを外部から添加しない、

(ii) 単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることのできる非水溶性の電子メディエーターを外部から添加しない、又は

(iii) 単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることのできる、酸化還元電位が0.3 V以上の電子メディエーターを外部から添加しない、

前記方法。

[11] 遊離型のフラビン化合物を電子メディエーターとして用いる発電方法であって、アノード及びカソードを使用し、

電解質に接触しているアノードにフラビン化合物を供給し、グルコース燃料を供給する工程を有し、

該アノードが、精製されたFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼ又は精製されたFAD依存性グルコースオキシダーゼを有する電極である、該発電方法、

ただし該方法は、

- (i) 単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることのできる人工電子メディエーターを外部から添加しない、
- (ii) 単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることのできる非水溶性の電子メディエーターを外部から添加しない、又は
- (iii) 単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることのできる、酸化還元電位が0.3V以上の電子メディエーターを外部から添加しない、

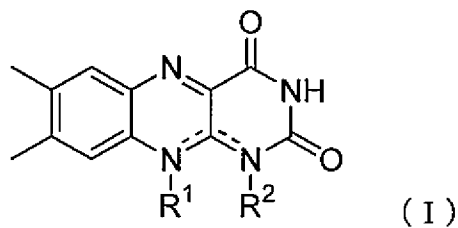
前記方法。

[12] 該フラビン化合物が固相中に固定化されている非酵素型のフラビン化合物である、10又は11に記載の方法。

[13] 精製されたFAD依存性グルコースオキシダーゼ又は精製されたFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼが固相中に固定化されている、10～12のいずれかに記載の方法。

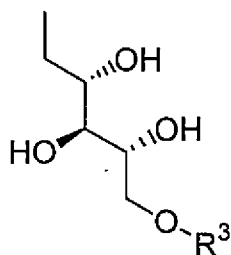
[14] フラビン化合物が以下の化学式(1)

[化4]



[式中、R<sup>1</sup>は存在しないか又は-CH<sub>3</sub>、若しくは

[化5]

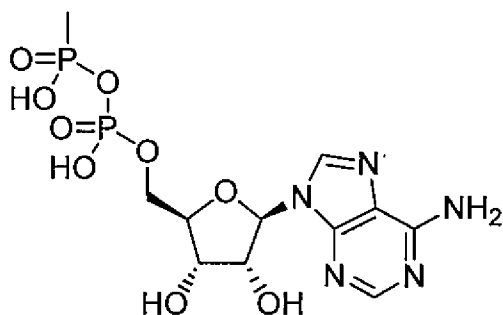


であり、R<sup>1</sup>が存在しない場合には、R<sup>1</sup>が連結して描かれている窒素原子は隣接炭素原子との間に二重結合を形成しておりかつR<sup>2</sup>はHであり、

R<sup>2</sup>は存在しないか、又はHであり、R<sup>2</sup>が存在しない場合には、R<sup>2</sup>が連結して描かれている窒素原子は隣接炭素原子との間に二重結合を形成しており、

R<sup>3</sup>は、H、リン酸基、又は

[化6]



である]

で表される化合物である、10～13のいずれかに記載の方法。

[15] フラビン化合物が、フラビンモノヌクレオチド、リボフラビン、ルミクロム、フラビンアデニンジヌクレオチド又はルミフラビンである、10～14のいずれかに記載の方法。

[16] 前記(i)において、人工電子メディエーターが、キノン類、フェナジン類、ピオロゲン類、シトクロム類、チオレドキシン類、フェノキサジン類、フェノチアジン類、フェリシアン化物、フェレドキシン類、フェロセン、フェロセン誘導体、及び金属錯体である、

前記(ii)において、非水溶性の電子メディエーターがフェロセン、非水溶

性のキノン類、非水溶性のフェナジン類、非水溶性のピオロゲン類、非水溶性のチオレドキシン類、非水溶性のフェノキサジン類、非水溶性のフェノチアジン類、非水溶性のフェレドキシン類、及び非水溶性のフェロセン誘導体である、又は

前記(iii)において、さらに、酸化還元電位が0.2 V以上の電子メディエーターを外部から添加しない、

10～15のいずれかに記載の方法。

[0017] 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2016-205539号の開示内容を包含する。

### 発明の効果

[0018] 本発明のフラビン化合物は、フェリシアン化カリウムのような従来のメディエーターと異なり、一般的には生体内に存在するものであり生体適合性が高く、人体に対する毒性がないか又は毒性が低いと考えられる。そのため、本発明のフラビン化合物を含む組成物や該フラビン化合物を用いる測定方法は、体内埋め込み型の連続グルコース測定に用いることができる。また本発明のフラビン化合物はグルコース燃料電池に応用することができる。

### 図面の簡単な説明

[0019] [図1] A t G L D 及び種々のフラビン化合物を用いた場合の応答電流を示す。  
[図2] G L D 1 及び種々のフラビン化合物を用いた場合の応答電流を示す。  
[図3] G O D 及び種々のフラビン化合物を用いた場合の応答電流を示す。  
[図4] M p G D H 及び種々のフラビン化合物を用いた場合の応答電流を示す。  
[図5] 種々の濃度のグルコースを含む試料について、G L D 1 及び F M N を用いた場合の応答電流を示す。  
[図6] 種々の濃度のグルコースを含む試料について、G D H - M 2 及び F M N を用いた場合の応答電流を示す。  
[図7] 種々の濃度のグルコースを含む試料について、G L D 1 及び F A D を用いた場合の応答電流を示す。  
[図8] 種々の濃度のグルコースを含む試料について、G D H - M 2 及び R F を

用いた場合の応答電流を示す。

[図9]種々の濃度のグルコースを含む試料について、GLD1及びLCを用いた場合の応答電流を示す。

### 発明を実施するための形態

#### [0020] (フラビン化合物及びフラビン化合物を含む組成物)

ある実施形態において本発明はフラビン化合物を提供する。別の実施形態において本発明はフラビン化合物を含むグルコース測定用組成物を提供する。本発明のフラビン化合物は、グルコースオキシダーゼやグルコースデヒドロゲナーゼにより触媒されるグルコース酸化還元反応において、メディエーターとして機能する。メディエーターとして機能するとは、フラビン化合物が電子移動に与ることをいい、例えば電極を用いる系では、本発明のフラビン化合物は、GOD又はGDHから電子を受け取って還元型となり、電極に電子を渡して酸化型に戻る。このような観点から、本発明のフラビン化合物のことを電子移動媒介剤と呼ぶこともできる。本明細書においてこれらの用語は同義とする。

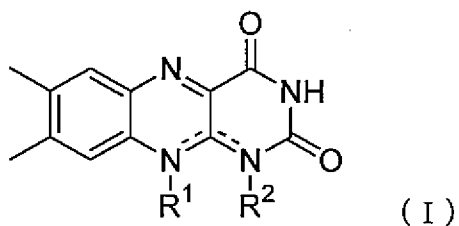
[0021] FAD依存性の、GODやGDHは、補酵素であるフラビン系化合物FADと共にホロ酵素を形成する。本明細書においてGODという場合、特に断らない限り、これはFAD依存性GODをいうものとする。本明細書においてGDHという場合、特に断らない限り、これはFAD依存性GDHをいうものとする。ホロ酵素においてFADは非共有結合により酵素と複合体を形成しており、通常、酵素中に埋没している。すなわちホロ酵素に含まれるFADは、溶液中に遊離していない。補酵素を有しないGODやGDHはアポ酵素と呼ばれグルコースに対する活性を示さない。本明細書において本発明のフラビン化合物というとき、これはホロ酵素中に含まれる補酵素を包含しないものとする。すなわち本発明のフラビン化合物は酵素から遊離している状態で存在する。特に断らない限り、本明細書において本発明のフラビン化合物というとき、これは遊離状態のフラビン化合物、遊離型のフラビン化合物をいうものとする。また、その裏返しとして、GODやGDHのホロ酵素

中に含有される補酵素FADは、本明細書にいう「本発明のフラビン化合物」に該当しない。

[0022] なお、ある実施形態において、本発明のフラビン化合物は、電極表面など固相中に固定化して使用することができる。このような場合にも、当該固定化されたフラビン化合物は、ホロ酵素中に含まれておらず、GODやGDH酵素と独立して存在する。したがって、このような固定化されたフラビン化合物も、便宜上、本明細書において、「遊離型のフラビン化合物」との用語に包含されるものとする。また、このようなGODやGDH酵素と独立して存在するフラビン化合物を、非酵素型フラビン化合物、非酵素結合型フラビン化合物、ということがある。非酵素型フラビン化合物や非酵素結合型フラビン化合物もまた、固相中に固定化されていてもよい。

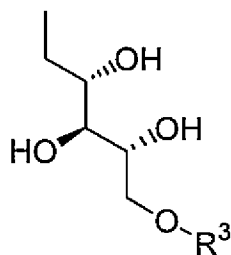
[0023] ある実施形態において、本発明のフラビン化合物は下記の一般式Iの化合物でありうる：

[化7]



[式中、R<sup>1</sup>は存在しないか又は-CH<sub>3</sub>、若しくは

[化8]

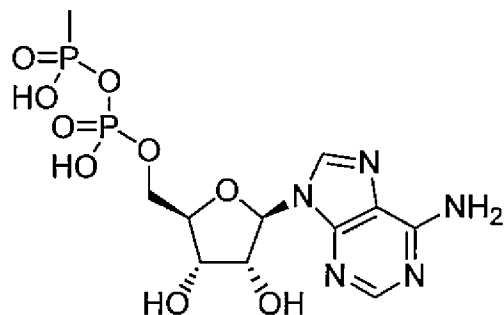


であり、R<sup>1</sup>が存在しない場合には、R<sup>1</sup>が連結して描かれている窒素原子は隣接炭素原子との間に二重結合を形成しておりかつR<sup>2</sup>はHであり、

$R^2$ は存在しないか、又はHであり、 $R^2$ が存在しない場合には、 $R^2$ が連結して描かれている窒素原子は隣接炭素原子との間に二重結合を形成しており、

$R^3$ は、H、リン酸基、又は

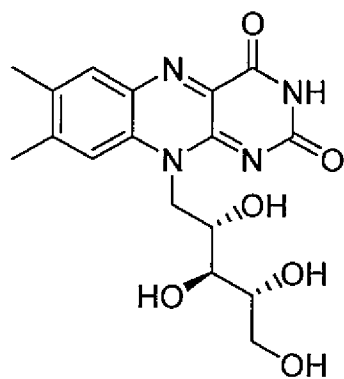
[化9]



である]。

[0024] ある実施形態において、本発明のフラビン化合物はリボフラビン（RF）である（CAS 83-88-5）。

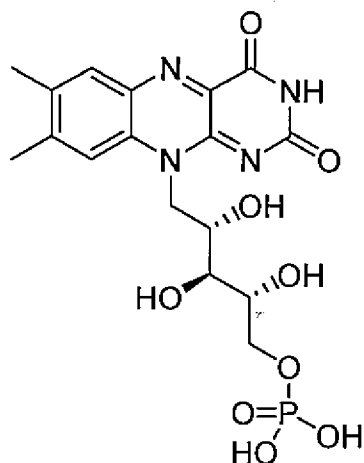
[0025] [化10]



[0026] ある実施形態において、本発明のフラビン化合物はフラビンモノヌクレオチド（FMN）である（CAS 146-17-8）。

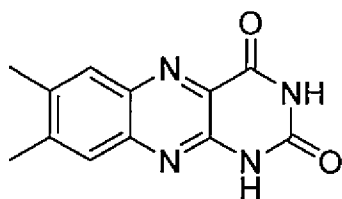
[0027]

[化11]



[0028] ある実施形態において、本発明のフラビン化合物はルミクロム（LC）である（CAS 1086-80-2）。

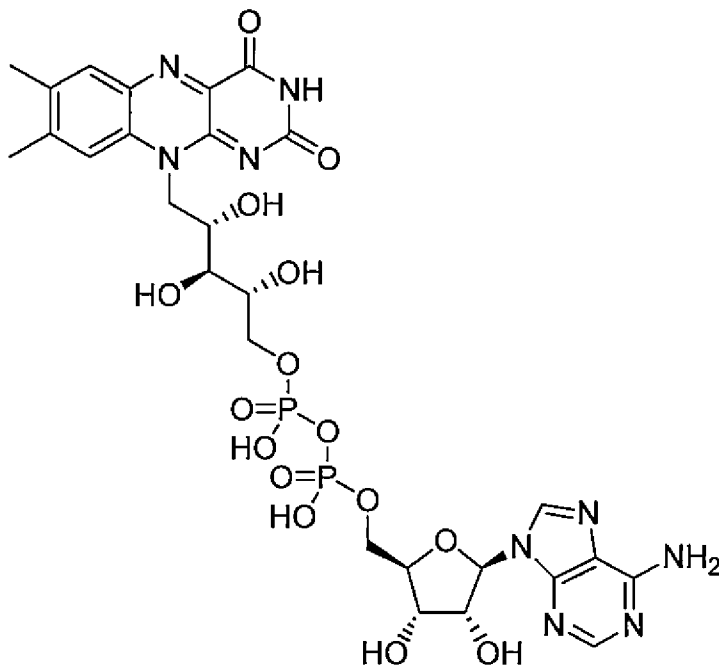
[0029] [化12]



[0030] ある実施形態において、本発明のフラビン化合物はフラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）である（CAS 146-14-5）。

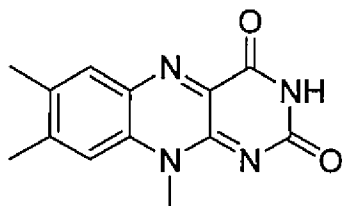
[0031]

[化13]



[0032] ある実施形態において、本発明のフラビン化合物はルミフラビン（L F）である（CAS 1088-56-8）。

[0033] [化14]



[0034] フラビン化合物には、一般に、3種の酸化還元状態及び3種のイオン化状態があることが知られている。上記の化学式では、本発明のフラビン化合物を、中性型で酸化型の形態で記載した。しかしながらこの形態のみならず、本発明のフラビン化合物は、酸化型（キノン型）、セミキノン型、又は還元型（ヒドロキノン型）であり得る。また、本発明のフラビン化合物は、中性型、又はアニオン型でありうる。便宜上、本発明のフラビン化合物、例えば上記化学式で表される本発明のフラビン化合物という場合、これは、中性型、又はアニオン型の、酸化型、セミキノン型、又は還元型の形態のものを包

含するものとする。例えば、測定系に、本発明のフラビン化合物として中性型で酸化型の化合物を添加した後、溶液のpHやプロトン授受によりそれが酸化型でアニオン型の化合物に変化することがあり得るが、そのような化合物も本発明のフラビン化合物に包含されるものとする。

[0035] 本発明のフラビン化合物は、人工合成してもよく、天然物を取得してもよい。また市販されているものであってもよい。

[0036] ある実施形態において、本発明のフラビン化合物は、グルコースデヒドロゲナーゼと共に使用しうる（FAD依存性GDH）。別の実施形態において、本発明のフラビン化合物は、グルコースオキシダーゼと共に使用しうる（FAD依存性GOD）。別の実施形態において、本発明のフラビン化合物を含む組成物は、グルコースデヒドロゲナーゼ又はグルコースオキシダーゼをさらに含む。GDH又はGODは溶液中に遊離していてもよく、固相に固定化された状態でもよい。GDH又はGODは、単独で存在してもよく、別の化合物やタンパク質、例えば酵素や抗体に連結されたものでもよい。

[0037] ある実施形態において、本発明のフラビン化合物を含む組成物は、

- (i) 外部から添加される、単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることのできる人工電子メディエーターを含まない、
- (ii) 外部から添加される、単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることのできる非水溶性の電子メディエーターを含まない、又は
- (iii) 外部から添加される、単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることのできる、酸化還元電位が0.3V以上の電子メディエーターを含まない。ある実施形態において、本発明の電極及び本発明のセンサーについても同様である。なお、本明細書では特に断らない限り、酸化還元電位は、銀塩化銀電極を基準としたものとする。

[0038] また、ある実施形態において、本発明のフラビン化合物を用いたグルコー

スの電気化学的測定方法及び発電方法は、

- (i) 単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることのできる人工電子メディエーターを外部から添加しない、
- (ii) 単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることのできる非水溶性の電子メディエーターを外部から添加しない、又は
- (iii) 単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることのできる、酸化還元電位が0.3V以上の電子メディエーターを外部から添加しない。なおここでいう外部から添加とは、測定直前や測定中の添加も、測定試薬調製における添加も包含する。

[0039] ある実施形態において、本発明のフラビン化合物を含む組成物、電極、及びセンサーは、外部から添加される、単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることのできる、酸化還元電位が0.3V以上、0.2V以上、0.1V以上、または0V以上、0.8V以下、0.7V以下、0.6V以下の電子メディエーターを含まない。別の実施形態では、本発明のフラビン化合物を含む組成物、電極、及びセンサーは、外部から添加される、単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることのできる、酸化還元電位が0~0.8V、0~0.7V、0~0.6V、0.1~0.7V、0.2~0.6V、0.3~0.8V、0.3~0.7V、0.3~0.6Vの電子メディエーターを含まない。ある実施形態において本発明のフラビン化合物を用いる方法についても同様にこれらは除外される。

[0040] ある実施形態において、本発明のフラビン化合物を含む組成物、電極、及びセンサーは、外部から添加される、単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取るこ

とのできる、非水溶性の電子メディエーターを含まない。非水溶性の電子メディエーターとしては、フェロセン、非水溶性のキノン類、例えばフェナントロリンキノン、非水溶性のフェナジン類、例えばフェナジン、非水溶性のピオロゲン類、非水溶性のチオレドキシン類、非水溶性のフェノキサジン類、非水溶性のフェノチアジン類、非水溶性のフェレドキシン類、及び非水溶性のフェロセン誘導体等が挙げられるがこれに限らない。ある実施形態において本発明のフラビン化合物を用いる方法についても同様にこれらは除外される。

[0041] ある実施形態において、本発明のフラビン化合物を含む組成物、電極、及びセンサーは、単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることのできる従来の人工電子メディエーターを含まない。ある実施形態において、本発明のフラビン化合物を用いる方法についても同様にこれらは除外される。単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることのできる従来の人工電子メディエーターとしては、系に人工的に外部から添加される、フェリシアン化カリウム、キノン類、アントラキノン類、フェナジン類、ピオロゲン類、シトクロム類、チオレドキシン類、フェノキサジン類、フェノチアジン類、フェリシアン化物、例えばフェリシアン化カリウム、フェレドキシン類、フェロセンまたはフェロセン誘導体、オスミウム錯体、コバルト錯体、ルテニウム錯体、鉄錯体、バナジウム錯体などの金属錯体であって、単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることのできるものが挙げられる。これらの化合物や誘導体は、スルホニル基、スルホ基、カルボニル基、カルボキシ基、アミノ基、イミノ基、ニトロ基、ニトロソ基、ヒドロキシ基、アルキル基（例えばC1～C16アルキル、例えばメチル基）、アルコキシ基、アシル基、シアノ基、ハロゲン基などの官能基を一又は複数、有しうる。具体的な電子メディエーター化合物としては、例えば1, 1'-ジメチルフェロセン、フェロセンカルボン酸、フェロセ

ンカルボキシアルデヒド、ベンゾキノン、ヒドロキノン、フェリシアン／フェロシアン化物（K若しくはNa塩、例えばフェリシアン化カリウム）、フェリシニウム／フェロセン、フェナジンメトサルフェート、1-メトキシ-5-メチルフェナジウムメチルサルフェイト、2,6-ジクロロフェノールインドフェノール、クロラニル(Chloranil)、ブロマニル(Bromanyl)、フェナントロリンキノン、アントラキノン、オクタシアノタングステン酸イオン、オクタシアノモリブデン酸イオン、 $[\text{Ni}(\text{PQ}_3)]^{2+}$ イオン、例えば $[\text{Ni}(\text{PQ}_3)]\text{Cl}_2$ 、 $[\text{Ni}(\text{PQ})_3]\text{Br}_2$ 、 $[\text{Os}(\text{dmo})_2(1\text{-ビニルイミダゾール})\text{X}]\text{X}$ 、 $[\text{Os}(\text{dmo})_2(1\text{-ビニルイミダゾール})\text{X}]\text{X}_2$ 、 $[\text{Os}(\text{dmo})_2(\text{イミダゾール})\text{X}]\text{X}$ 、 $[\text{Os}(\text{dmo})_2(\text{イミダゾール})\text{X}]\text{X}_2$ 、 $[\text{Os}(\text{dmo})_2(1\text{-メチルイミダゾール})\text{X}]\text{X}_2$ 、 $[\text{Os}(\text{dmo})_2(\text{メチルイミダゾール})\text{X}]\text{X}_2$ （これらの化合物においてdmoは4,4'-ジメトキシ-2,2'-ビピリジンであり、Xはハロゲンである）であって、単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることのできるもの等が挙げられる。

[0042] ある実施形態において、単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることのできる人工電子メディエーターは、フェリシアン化カリウム、フェロセン、 $[\text{Ni}(\text{PQ}_3)]\text{Cl}_2$ 、及び $[\text{Ni}(\text{PQ})_3]\text{Br}_2$ である。したがって、ある実施形態において、本発明のフラビン化合物を含む組成物、電極、及びセンサーは、フェリシアン化カリウム、フェロセン、 $[\text{Ni}(\text{PQ}_3)]\text{Cl}_2$ 、及び $[\text{Ni}(\text{PQ})_3]\text{Br}_2$ を含まない。またある実施形態において、本発明の方法ではこれらは添加されない。

[0043] ルテニウム錯体を単独の電子メディエーターとした場合、所定の電位を印加しても、FAD依存性GDHはルテニウム錯体から電子を受け取らないことが知られている。一方で、ルテニウム錯体及びFAD依存性GDHを含む系に1-mPMSを添加すると、所定の電位を印加した場合、ルテニウム錯体が電子を受け取ることができるようになることが知られている（特開2013-083634参照）。特定の理論に拘束されることを望むものではないが、ルテニウム錯体とFAD依存性GDH間における相互作用により、GDHに含有さ

れているFADに、ルテニウム錯体が電子を受け取ることができる程度に十分に近接することができないと考えられる。そのため、ルテニウム錯体を単独の電子メディエーターとしてFAD依存性GDHと共に使用した場合、所定の電位を印加しても応答電流が観測されないものと考えられる。他方で、この系に単独で電子をFAD依存性GDHから直接受け取ることのできる別の人工電子メディエーターである1-mPMSが存在すると、まず、1-mPMSがFAD依存性GDHから電子を受け取り、次いでルテニウム錯体に電子を受け渡すと考えられる。このとき、単独の電子メディエーターとしてのルテニウム錯体及びFAD依存性GDHを含む系にあっては、ルテニウム錯体は、本明細書にいう「単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることのできる人工電子メディエーター」に該当しない。しかしながら、系に1-mPMSがさらに存在するとルテニウム錯体は電子を受け取ることができるようになる。そのため、電子メディエーターとして1-mPMS及びルテニウム錯体を含み、FAD依存性GDHを含む系にあっては、1-mPMS及びルテニウム錯体の組み合わせは、電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることができる。このとき、1-mPMSの代わりに本発明のフラビン化合物を用いると、FAD依存性GDHから溶液中に存在する遊離型のフラビン化合物が電子を受け取り、次いで該フラビン化合物が該電子をルテニウム錯体に受け渡すことができるようになると考えられる。ある実施形態において、本発明は、このような電子メディエーターと本発明のフラビン化合物の組み合わせを含む。すなわち、ある実施形態において、本発明のグルコース測定用組成物は、遊離型のフラビン化合物を含み、精製されたFAD依存性グルコースオキシダーゼ又は精製されたFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼを含み、単独では電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることができないが、本発明のフラビン化合物との共存下では、本発明のフラビン化合物から電子を受け取ることのできるル

テニウム錯体、例えばヘキサアンミンルテニウムを含む。また、逆にいうと、このような電子メディエーターと本発明のフラビン化合物の組み合わせは本発明から除外されない。したがって、本発明の組成物からは、単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることのできる人工電子メディエーターは除かれるが、FAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから電子を受け取った遊離型の本発明のフラビン化合物から電子をさらに受け取ることのできる従来の人工電子メディエーターは除かれない（本発明に含まれる）。別の言い方をすると、本発明の組成物からは、単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから直接受け取ることのできる人工電子メディエーターは除かれる。本発明の電極、センサー、方法についても同様である。

[0044] なお、上記において、組成物または測定系に外部から添加される、とは、グルコース濃度測定において、応答電流に影響を及ぼしうる濃度での添加をいう（グルコース測定上有効な量での添加）。例えばグルコース濃度測定において、応答電流に影響を及ぼさない程度の微量の人工電子メディエーターを外部から本発明の組成物に添加したとしても、それは本発明の組成物を用いたグルコース濃度測定に何ら影響を及ぼすものではなく、したがって本発明に包含される。また、本発明の組成物が、外部添加される人工電子メディエーターを含まない、とは、外部添加される人工電子メディエーターを実質的に含まないことを意味し、すなわち、応答電流に影響を及ぼさない程度の微量の人工電子メディエーターを含んでもよいが、応答電流に影響を及ぼす実質的な量の人工電子メディエーターは含まないことをいう。したがってある実施形態において、応答電流に影響を及ぼす実質的な量の単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることのできる人工電子メディエーターを含む組成物は本発明から除かれる。また、人体に関連するグルコース濃度測定において、人体に悪影響を及ぼさず許容される量であって、応答電流に影響を及ぼさない

程度のごく微量の単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることのできる人工電子メディエーターを外部から本発明の組成物に添加したとしても、それは本発明の組成物を用いたグルコース濃度測定に何ら影響を及ぼすものではなく、したがって本発明に包含される。本発明の電極、センサー、及び方法についても同様である。

[0045] 本発明者は、以前にFAD依存性GDHをシトクロムと連結した融合タンパク質について報告した（国際公開第2017/094776号）。当該文献では融合タンパク質は、Cytb-GDHやGDH-Cytbと表記されている。ある実施形態では、FAD依存性GDHとしてこのような融合タンパク質を使用しうる。このとき、融合タンパク質（Cytb-GDH等）に包含されるシトクロム部分は、融合タンパク質の一部であって、本明細書にいう、外部から添加されるシトクロムに該当しない。したがってある実施形態では、遊離型のフラビン化合物を含み、精製されたグルコースデヒドロゲナーゼシトクロム融合タンパク質を含む、グルコース測定用組成物が提供され、ただし、この組成物は外部から添加されるシトクロムを含まない。

[0046] （GDH又はGODの固定化方法）

GDHやGODは任意の公知の方法により固相に固定化されうる。例えばGDHやGODをビーズや膜、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、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GOD又はGDH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。固定化するGDHやGODの量は、電気化学的測定或いは燃料電池発電に必要な電流を生じうる量とすることができ、適宜決定しうる。

[0047] （本発明のフラビン化合物の固定化方法）

ある実施形態において、本発明のフラビン化合物は、溶液中に単独で存在していてもよく、また、ビーズや膜、電極表面等の固相に固定化されていてもよい。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、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。固定化するフラビン化合物の量は、電気化学的測定或いは燃料電池発電に必要な電流を生じうる量とすることができ、適宜決定しうる。

[0048] ある実施形態では、本発明のフラビン化合物が固定化され、さらにGDH又はGODが固定化されていてもよい。この場合、これらは同一又は異なる方法により固定化されていてもよい。

[0049] 試料溶液に添加する本発明のフラビン化合物の終濃度は特に限定されず、例えば、0.01～200mM、0.02～150mM、0.03～100mM、0.04～80mM、0.05～60mM、0.06～50mM、0.08～40mM、0.1mM～30mM、0.15～20mM、0.2～10mM、0.3～5mM、0.4～3mM、例えば0.05～10mMの範囲であり得る。試料溶液に添加する本発明のフラビン化合物の終濃度は特に限定されず、例えば0.001～5% (w/v)、0.003～3% (w/v)、0.005～1% (w/v)、0.01～0.5% (w/v)、0.02～0.3% (w/v)、0.03～0.1% (w/v) であり得る。なお、フラビン化合物と他の酵素や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。

[0050] フラビン化合物をGODと共に使用する場合、試料に含まれる又は試料中に生成すると推定される還元型のメディエーターの濃度範囲に対応して、電気化学的測定用試薬の各成分の濃度を調節することができる。

[0051] 特に断らない限り、本発明の組成物に含まれるグルコースデヒドロゲナーゼ又はグルコースオキシダーゼは、精製された酵素である。GOD又はGDHを含む細胞抽出物や細胞破碎液、粗酵素抽出液は、GODやGDH以外に

も様々な夾雑物質を含む。例えば微生物では粗酵素抽出液中のリボフラビン量は約53～133  $\mu\text{M}$ との報告がある (J Indust Micro Biotech 1999, 22, pp. 8-18)。このような粗酵素抽出液等は、そのまま電気化学的測定に供すると、夾雑物質が電子を受け取るなどして電極への電子の授受が妨害されるため、粗酵素抽出液において、このリボフラビン濃度では正確な電気化学的測定は困難である。そこで本発明の電気化学的グルコース測定法では、夾雑物質が除去されたGOD又はGDHを使用する。本明細書においてGOD又はGDHが精製されている、又は精製酵素である、とは、必ずしもタンパク質が純品である必要はなく、グルコースの電気化学的測定が可能な程度に酵素標品から夾雑物質が除去されていることをいう。

[0052] (グルコースデヒドロゲナーゼ)

グルコースデヒドロゲナーゼは天然に広く存在し、微生物や動植物起源の酵素を探索することにより得ることができる。微生物においては、例えば、糸状菌、酵母または細菌等から得ることができる。本発明のグルコースデヒドロゲナーゼは例えば、ケカビ亜門、ケカビ綱、ケカビ目、ケカビ科に分類される微生物、例えばムコール (*Mucor*) 属、アブシジア (*Absidia*) 属、アクチノムコール (*Actinomucor*) 属、カラクサケカビ (*Circinella*) 属などの生物種に由来するGDHまたはその改変体であり得る。

[0053] ムコール (*Mucor*) 属の微生物としては、ムコール・プライニ (*Mucor prainii*)、ムコール・シルシネロイデス (*Mucor circinelloides*)、ムコール・ヒエマリス (*Mucor hiemalis*)、ムコール・サブチリスマス (*Mucor subtilissimus*)、ムコール・ギリエルモンディ (*Mucor guilliermondii*)、ムコール・ジャバニカス (*Mucor javanicus*)、ムコール・ダイモルフオスポラス (*Mucor dimorphosporus*) が挙げられる。Absidia属の微生物としては、アブ

シジア・シリンドロスポラ (*Absidia cylindrospora*)、アブシジア・ヒアロスポラ (*Absidia hyalospora*) を挙げることができる。Actinomucor 属微生物としては、アクチノムコール・エレガンス (*Actinomucor elegans*) を挙げることができる。カラクサケカビ (*Circinella*) 属の微生物としては、シルシネラ・シンプレックス (*Circinella simplex*)、シルシネラ属種 (*Circinella* sp.)、シルシネラ・アンガレンシス (*Circinella angarensis*)、シルシネラ・シネンシス (*Circinella chinensis*)、シルシネラ・ラクリミスポラ (*Circinella lacrymispora*)、シルシネラ・マイナー (*Circinella minor*)、シルシネラ・ムコロイデス (*Circinella mucoroides*)、シルシネラ・リジダ (*Circinella rigida*)、シルシネラ・アンベラータ (*Circinella umbellata*) 及びシルシネラ・ムスカエ (*Circinella muscae*) を挙げることができる。ある実施形態において、GDHは *Aspergillus oryzae* 由来のものでありうる。ある実施形態において、GDHはBBI社の製品コードGLD1のGDHでありうる (*Aspergillus oryzae* 由来)。ある実施形態においてGDHは *Aspergillus terreus* 由来GDHでありうる (特許第5020070号参照)。

[0054] (グルコースオキシダーゼ)

グルコースオキシダーゼは天然に広く存在し、微生物や動植物起源の酵素を探索することにより得ることができる。微生物においては、例えば、糸状菌、酵母または細菌等から得ることができる。本発明のグルコースオキシダーゼは例えば、アスペルギルス属、ペニシリウム属、ミツバチ (*Apis*) 属、ムコール属、フザリウム属、ストレプトマイセス属、タラロマイセス属などの生物種に由来するGODまたはその改変体であり得る。ある実施形態において、GODは東洋紡社のカタログ番号GLO-201のものでありう

る（アスペルギルス属由来）。なお、G L O - 2 0 1 の製品カタログの構造（Structure）の欄には、2モルのF A Dを伴った糖タンパク質（Glycoprotein with 2 moles of FAD）とあり、これはホロ酵素である。

[0055]（G O D又はG D H遺伝子）

G O D又はG D Hをコードする遺伝子を得るには、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が用いられる。例えば、G O D又はG D H生産能を有する微生物菌体や種々の細胞から常法、例えば、Current Protocols in Molecular Biology (WILEY Interscience, 1989) 記載の方法により、染色体DNAまたは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またはcDNAを用いて、染色体DNAまたはcDNAのライブラリーを作製することができる。

[0056] 次いで、G O D又はG D Hのアミノ酸配列に基づき、適当なプローブDNAを合成し、これを用いて染色体DNAまたはcDNAのライブラリーからG D H遺伝子を選抜する方法、あるいは、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、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、目的遺伝子の全長を含むDNAを得ることができる。

[0057] G D Hをコードする遺伝子としては公知のあらゆる遺伝子を使用可能であり、例えばMucor属由来のG D H遺伝子（特許第4648993号に記載のもの）が挙げられる。この遺伝子を改変したものを用いてもよく、例えば国際公開第2012/169512号及び国際公開第2015/099112号に記載の改変遺伝子などが挙げられる。また特許第4648993号に記載のMucor prainii由来のG D H（MpGDHともいう）にT387A/1545T変異を導入した変異体を用いてもよい。またG D Hをコードする遺伝子の例として、Aspergillus terreu

s由来のGDH遺伝子 (AtGLD) が挙げられる (特許第5020070号)。

[0058] GODをコードする遺伝子としては公知のあらゆる遺伝子を使用可能であり、例えばアスペルギルス属由来のGOD遺伝子が挙げられる。遺伝子は改変されたものでもよい。

[0059] これらの遺伝子は、各種ベクターに連結または挿入してもよく、染色体やゲノムに組み入れてもよい。ベクターを用いる場合、ベクターへのクローニングには、TA Cloning Kit (インビトロジェン社) やIn-Fusion HD Cloning Kit (クロンテック社) などの市販のキット; pUC119 (タカラバイオ社)、pUC18 (タカラバイオ社)、pBR322 (タカラバイオ社)、pBluescript SK+ (ストラタジーン社)、pYES2/CT (インビトロジェン社) などの市販のプラスミドベクターDNA;  $\lambda$ EMBL3 (ストラタジーン社) などの市販のバクテリオファージベクターDNAが使用できる。該組換え体DNAを用いて、宿主生物、例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*)、好ましくは大腸菌JM109株 (タカラバイオ社) や大腸菌DH5 $\alpha$ 株 (タカラバイオ社) を形質転換する。得られた形質転換体に含まれる組換え体DNAを、QIAGEN Plasmid Mini Kit (キアゲン社) などを用いて精製する。

[0060] (GOD又はGDHの製造)

GOD又はGDHは、上述のように取得した形質転換細胞を培養し、前記細胞中に含まれるGOD又はGDH遺伝子を発現させ、次いで、前記培養物から発現タンパク質を単離することにより製造すればよい。

[0061] 糸状菌を培養する通常の培地、すなわち炭素源、窒素源、無機物、その他の栄養素を適切な割合で含有するものであれば、合成培地及び天然培地のいずれでも使用できる。また、上記微生物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。

[0062] 培養条件は、当業者により通常知られる糸状菌の培養条件を採用すればよく、例えば、培地の初発pHは5～10に調整し、培養温度は20～40℃、培養時間は数時間～数日間、好ましくは1～7日間、より好ましくは2～5日間など、適宜設定することができる。培養手段は特に限定されず、通気攪拌深部培養、振盪培養、静地培養などを採用することができるが、溶存酸素が十分になるような条件で培養することが好ましい。例えば、アスペルギルス属微生物を培養する場合の培地及び培養条件の一例として、後述する実施例に記載があるDPY培地を用いた、30℃、160rpmでの3～5日間の振盪培養が挙げられる。微生物宿主細胞を培養する際は、10～42℃の培養温度、好ましくは25℃前後の培養温度で4～24時間、さらに好ましくは25℃前後の培養温度で4～8時間、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。

[0063] 培養終了後、該培養物よりGOD又はGDH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、培地上清画分を回収するか、または、常法により菌体を、超音波破壊処理、磨砕処理等するか、又はリゾチーム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、GOD又はGDHの粗酵素を得る。

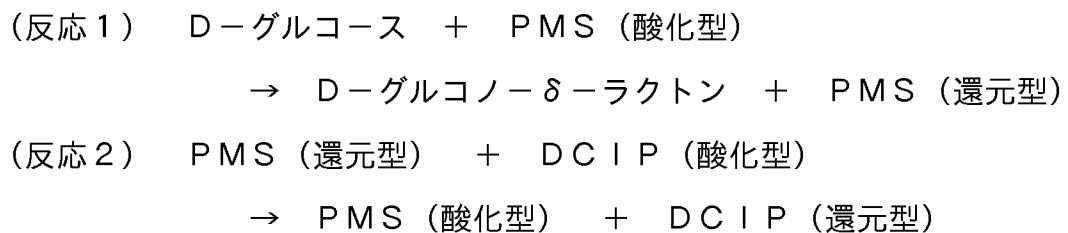
[0064] 粗酵素を、公知の任意の手段を用いてさらに精製することもできる。精製された酵素標品を得るには、例えば、セファデックス、ウルトロゲル若しくはバイオゲル等を用いるゲルろ過法；イオン交換体を用いる吸着溶出法；ポ

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；疎水性クロマトグラフィー法；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、精製された酵素標品を得ることができる。

[0065] 酵素が精製されているか否かの判断は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法及び染色により行ってもよく、また、濃度既知のグルコース試料を用いて適性にグルコースの電気化学的測定ができるか試験することにより行ってもよい。

[0066] (GDHの活性測定)

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ーδ-ラク톤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。



[0067] 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。

[0068] 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 (pH 7. 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、15 mM PMS溶液 0.1 mL及び酵素サンプル溶液0.1 mL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600 nmにおける吸光度の1分間あたりの減少量 ( $\Delta A_{600}$ ) 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200 mMのD-グルコース存在下で1分間に1  $\mu\text{mol}$  のDCIPを還元する酵素量を1 Uと定義する。

[0069] [数1]

$$\text{GDH活性 (U/mL)} = \frac{-(\Delta A_{600} - \Delta A_{600_{\text{blank}}}) \times 3.0 \times df}{16.3 \times 0.1 \times 1.0}$$

[0070] 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 ( $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$ )、0.1は酵素溶液の液量 (mL)、1.0はセルの光路長 (cm)、 $\Delta A_{600_{\text{blank}}}$  は100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 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は希釈倍数を表す。

[0071] (GODの活性測定)

GOD (EC 1.1.3.4) は、グルコースの水酸基を酸化してグルコノ- $\delta$ -ラクトン及び過酸化水素を生成する反応を触媒する。

GODの活性は、この作用原理を利用し、生成する過酸化水素をペルオキシダーゼと反応させ、発色剤を発色させることにより測定することができる。

[0072] グルコースオキシダーゼ活性の測定方法

<試薬>

100 mM MES-Na緩衝液 pH 5.7

0.5% 4-アミノアンチピリン (東京化成工業社製、4AA) 溶液

5.0 g/L TOOS (N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トリジンナトリウム、同仁化学社製) 溶液

400 U/mL パーオキシダーゼ（キッコーマン社製、POD）溶液

1. 2 M D-グルコース溶液

上記MES-Na緩衝液30.0 mL、4AA溶液0.3 mL、TOOS溶液0.3 mL

L、POD溶液0.3 mL、D-グルコース溶液6.0 mLを混合して反応試薬とする。

[0073] <測定条件>

反応試薬3 mLを37℃で5分間予備加温する。GOD溶液0.1 mLを添加しゆるやかに混和後、水を対照に37℃に制御された分光光度計で、555 nmにおける吸光度を測定する。測定値は、555 nmにおける1分後から3分後の1分間あたりの吸光度変化とする。37℃、1分あたりに生成される過酸化水素のマイクロモル数を酵素液中の活性単位（U）とし、下記の式に従って算出する。

$$\text{活性 (U/mL)} = \{ (\Delta A_s - \Delta A_0) \times 3.1 \times df \} \div (32.8 \times 0.5 \times 0.1)$$

$\Delta A_s$  : 反応液の1分間あたりの吸光度変化

$\Delta A_0$  : 対照液の1分間あたりの吸光度変化

32.8 : 反応により生成されるキノンイミン色素の  
ミリモル吸光係数 ( $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )

0.5 : 1 molの過酸化水素による生成されるキノンイミン色素の  
mol数

df : 希釈係数

[0074] (グルコースアッセイキット)

ある実施形態において本発明は、本発明のフラビン化合物を含むグルコースアッセイキットを提供する。ある実施形態において、このキットはGDHを含む。別の実施形態においてこのキットはGODを含む。このキットを用いることにより、GOD又はGDHを用いて血中のグルコース（血糖値）を測定することができる。測定は連続的に行ってもよい。

[0075] 本発明のグルコースアッセイキットは、少なくとも1回のアッセイに十分な量の本発明のフラビン化合物を含む。典型的には、本発明のグルコースアッセイキットは、本発明のフラビン化合物に加えて、GOD又はGDH、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標準溶液、ならびに指針を含む。ある実施形態において、本発明のグルコースアッセイキット、例えばSMBG用、CGM用、またはFGM用のグルコースアッセイキットは、本発明のフラビン化合物とGOD又はGDHとを同一試薬として含む。別の実施形態において、本発明のグルコースアッセイキットは、フラビン化合物とGOD又はGDHとを別々の試薬として含む。本発明のフラビン化合物は種々の形態で、例えば、凍結乾燥された試薬として、ビーズや電極表面に固定化された試薬として、または適切な保存溶液中の溶液、好ましくは遮光されている溶液として提供することができる。

[0076] グルコース濃度の測定は、比色式グルコースアッセイキットの場合は、例えば、以下のように行うことができる。グルコースアッセイキットの反応層には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。

[0077] 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、たとえば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、

600 nm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、570 nm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。

[0078] （グルコースセンサー）

ある実施形態において本発明は、本発明のフラビン化合物を用いるグルコースセンサーを提供する。本発明のグルコースセンサーは、本発明のフラビン化合物及びGDH又はGODを有する。グルコースセンサーの電極としては、カーボン電極、金電極、白金電極などを用い、この電極上にGOD又はGDH酵素を塗布または固定化することができる。さらに、或いはこれと独立して、本発明のフラビン化合物を電極上に塗布または固定化してもよい。固定化方法としては、上記の「GDH又はGODの固定化方法」の段落を参照のこと。

[0079] 本発明のフラビン化合物及びGOD又はGDHは、ポテンショスタットやガルバノスタットなどを用いることにより、種々の電気化学的な測定手法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、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、ポテンシオメトリー、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−1000 mV〜+1000 mV（vs. Ag/AgCl）などとすることができる。

[0080] （グルコースの電気化学的測定）

ある実施形態において、本発明は、グルコースを含みうる試料と、遊離型フラビン化合物と、精製されたグルコースオキシダーゼ又は精製されたグルコースデヒドロゲナーゼとを接触させる工程及び電流を測定する工程を含む、グルコースの電気化学的測定方法を提供する。該フラビン化合物及び／又

は酵素は固相中に固定化されていてもよい。

[0081] 例えばグルコース濃度の電気化学的測定は、以下のようにして行うことができる。恒温セルに緩衝液を入れ、一定温度に維持する。作用電極としてGDH又はGODを固定化した電極を用い、対極（例えば白金電極）および参照電極（例えばAg/AgCl電極やAg/Ag<sup>+</sup>電極）を用いる。反応液に本発明のフラビン化合物を添加する。カーボン電極に一定の電圧を印加して、電流が定常になった後、グルコースを含む試料を加えて電流の増加を測定する。標準濃度のグルコース溶液により作製したキャリブレーションカーブに従い、試料中のグルコース濃度を計算することができる。印加する電位は、例えば+800mV以下、+700mV以下、+600mV以下、+500mV以下、+400mV以下、+300mV以下、+200mV以下、+100mV以下、+50mV以下とすることができ、-200mV以上、-100mV以上、-50mV以上、例えば0mV以上、とすることができ、例えば+800mV~-200mV、+800mV~-100mV、+800mV~-50mV、+600mV~0mV、+500mV~0mV、+400mV~0mV、+300mV~0mV、+200mV~0mVとすることができ（いずれも銀塩化銀参照電極に対し）。

[0082] 具体的な例としては、グラッシーカーボン（GC）電極に0.2U~150U、より好ましくは、0.5U~100UのGDH又はGODを固定化し、グルコース濃度に対する応答電流値を測定する。電解セル中に、100mMリン酸カリウム緩衝液（pH6.0）10.0mlを添加する。GC電極をポテンショスタットBAS100B/W（BAS製）に接続し、37℃で溶液を攪拌し、銀塩化銀参照電極に対して+500mVを印加する。これらの系に1M D-グルコース溶液を終濃度が5、10、20、30、40、50mMになるよう添加し、添加ごとに定常状態の電流値を測定する。この電流値を既知のグルコース濃度（5、10、20、30、40、50mM）に対してプロットし、検量線を作成する。これよりGDH又はGOD酵素固定化電極でグルコースの定量が可能となる。

[0083] さらに電気化学測定のために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。この場合、電極は絶縁基板上に形成されてなることが好ましい。具体的には、フォトリソグラフィ技術や、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ることが望ましい。また、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るが、各種の溶媒や薬品に対する耐性の強いものを用いるのがより好ましい。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  $1\text{ mm}^2$  以上、 $1.5\text{ mm}^2$  以上、 $2\text{ mm}^2$  以上、 $2.5\text{ mm}^2$  以上、 $3\text{ mm}^2$  以上、 $4\text{ mm}^2$  以上、 $5\text{ mm}^2$  以上、 $6\text{ mm}^2$  以上、 $7\text{ mm}^2$  以上、 $8\text{ mm}^2$  以上、 $9\text{ mm}^2$  以上、 $10\text{ mm}^2$  以上、 $12\text{ mm}^2$  以上、 $15\text{ mm}^2$  以上、 $20\text{ mm}^2$  以上、 $30\text{ mm}^2$  以上、 $40\text{ mm}^2$  以上、 $50\text{ mm}^2$  以上、 $1\text{ cm}^2$  以上、 $2\text{ cm}^2$  以上、 $3\text{ cm}^2$  以上、 $4\text{ cm}^2$  以上、 $5\text{ cm}^2$  以上、例えば  $10\text{ cm}^2$  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  $10\text{ cm}^2$  以下、 $5\text{ cm}^2$  以下、例えば  $1\text{ cm}^2$  以下、とすることができる。対極も同様でありうる。

[0084] ある実施形態では、本発明のグルコースセンサーを有する持続血糖測定装置を提供する。持続血糖測定装置は、24時間を通した血糖値の変動を把握することが可能となるCGM(continuous glucose monitoring)デバイスやFGM(Flash glucose monitoring)デバイスを含みうる。またある実施形態において、本発明は、本発明の組成物、電極又はセンサーを用いる連続グルコースモニタリング方法を提供する。

[0085] ある実施形態において、本発明のCGMデバイスは、皮膚の下に配置するためのグルコースセンサーを有しうる。センサーは一定期間、例えば1日～3週間、装着されうる。センサーは使い捨て型であってもよく、再利用可能であってもよい。センサーは、組織と酵素の直接接触を防ぐためのセンサーメンブレン層を有し得る。センサーは、アプリケーターを用いて腹部に挿入するよう設計しうる。ある実施形態において、本発明は発信機及びセンサーから発

信機への連結部をさらに有するCGMデバイスを提供する。発信機はインプラントせずともよい。好ましくは発信機は、電波受信機と通信可能である。CGMデバイスはさらに、グルコースレベルを連続的に表示する電氣的受信機を有し得る。CGMデバイスは場合により、キャリブレーション用のフィンガースティック（指先穿刺部材）を有し得る。CGMデバイスは使用説明書を有し得る。

[0086] （本発明の燃料電池）

ある実施形態において本発明は、本発明のフラビン化合物や、フラビン化合物を含む組成物を有する燃料電池用のアノード及び当該アノードを備えた燃料電池を提供する。ある実施形態において本発明は、本発明のフラビン化合物や、フラビン化合物を含む組成物、または該アノードを使用し、グルコースを燃料とする発電方法を提供する。

[0087] 本発明の燃料電池は、本発明のフラビン化合物、燃料槽、カソード、GOD又はGDHを有するアノード、及び電解質を備えている。また本発明の燃料電池は、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、本発明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、本発明の燃料電池の一部ではなく、本発明の燃料電池は、適当な負荷抵抗に接続できるよう構成されている。本発明の燃料電池においてGOD又はGDHはアノードの一部を構成する。例えばGOD又はGDH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。燃料槽はグルコースを含む。すなわち本明細書において燃料電池という場合、特に断らない限りこれはグルコースを燃料とするものをいう。GOD又はGDHの作用によりグルコースが酸化され還元型メディエーターが生じ、これが電極に電子を受け渡すと電流が流れる。ある実施形態において本発明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、グラッシーカーボン、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。

[0088] 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。カソード用メディエーターはアノード用メディエーターと同一でも異なってもよい。酸化剤としては、酸素、過酸化水素等が挙げられる。

[0089] 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）のカソード電極の周囲に配置することができる。

[0090] 本発明の発電方法は、GOD又はGDHを有するアノードに燃料となるグルコースを供給する工程を含む。GOD又はGDHを有するアノードにグルコースが供給されると、グルコースが酸化され、D-グルコノ- $\delta$ -ラクトンとなり、同時に生成した電子を、GOD又はGDH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、例えばフラビン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）を通し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。

[0091] 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。

[0092] 本発明のフラビン化合物や、フラビン化合物を含む組成物は、試料中のグルコース濃度測定に使用することができ、これは例えば糖尿病の診断や血糖値の自己モニタリングに役立てることができる。また、本発明の組成物は酵素電極と共に使用することができ、種々の電気化学的測定に用いることができる。また、本発明の組成物は酵素センサーと共に使用することができる。また、本発明の組成物はグルコース測定キットやグルコースセンサーに利用することができる。さらに本発明のフラビン化合物や、フラビン化合物を含む組成物は、燃料電池に用いることができる。すなわち本発明のフラビン化合物や、フラビン化合物を含む組成物は、グルコースを燃料とする発電方法に使用することができる。これは例示であり、本発明のフラビン化合物又はフラビン化合物を含む組成物の用途はこれに限られない。

[0093] 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。

## 実施例

[0094] [実施例 1]

### 1. *Mucor* 属由来 GDH 遺伝子の宿主への導入と GDH 活性の確認

まず特許第 4 6 4 8 9 9 3 号に記載の *Mucor* 属由来 GDH (MpGDH) に T 3 8 7 A / I 5 4 5 T の各変異を導入した GDH 変異体をコードする遺伝子を取得した。MpGDH 変異体のアミノ酸配列は配列番号 1 に示し、その遺伝子の塩基配列は配列番号 2 に示す。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 変異体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変異体遺伝子を、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変異体）を得た。

[0095] また、Mucor属由来GDH（MpGDH、配列番号1）にN66Y/N68G/C88A/Q233R/T387C/E554D/L557V/S559Kの各変異を導入した改変GDH（MpGDH-M1）をコードする遺伝子を取得した。MpGDH-M1のアミノ酸配列は配列番号3に示し、その遺伝子の塩基配列は配列番号4に示す。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-M1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。上記と同様に、pUC19のマルチクローニングサイトにあるIn-Fusion Cloning Siteにて、MpGDH-M1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-M1）を得た。

[0096] 得られた組換え体プラスミドpUC19-MpGDH-M1を鋳型として、配列番号7-12の合成オリゴヌクレオチド、KOD-Plus-（東洋紡社製）を用い、以下の条件でPCR反応を行った。

[0097] すなわち、10×KOD-Plus-緩衝液を5 $\mu$ l、dNTPが各2mMになるよう調製されたdNTPs混合溶液を5 $\mu$ l、25mMのMgSO<sub>4</sub>溶液を2 $\mu$ l、鋳型となるMpGDH-M1遺伝子を連結させたDNAコンストラクトを50ng、上記合成オリゴヌクレオチドをそれぞれ15pmol、KOD-Plus-を1Unit加えて、滅菌水により全量を50 $\mu$ lとした。調製した反応液をサーマルサイクラー（エッペンドルフ社製）を用いて、94℃で2分間インキュベートし、続いて、「94℃、15秒」-「50℃、30秒」-「68℃、8分」のサイクルを30回繰り返した。

[0098] 反応液の一部を1.0%アガロースゲルで電気泳動し、約8,000bpのDNAが特異的に増幅されていることを確認した。こうして得られたDNAを制限酵素DpnI(N

EW ENGLAND BIOLABS社製) で処理し、残存している鋳型DNAを切断した後、大腸菌JM109を形質転換し、LB-amp寒天培地に展開した。生育したコロニーをLB-amp培地[1%(W/V) バクトトリプトン、0.5%(W/V) ペプトン、0.5%(W/V) NaCl、50  $\mu$ g/ml Ampicillin]2.5mlに接種して、37℃で20時間振とう培養し、培養物を得た。この培養物を7,000rpmで、5分間遠心分離することにより集菌して菌体を得た。次いで、この菌体よりQIAGEN tip-100(キアゲン社製) を用いて組換え体プラスミドを抽出して精製し、DNA2.5  $\mu$ gを得た。該プラスミド中のMpGDH-M1をコードするDNAの塩基配列を、マルチキャピラリーDNA解析システムApplied Biosystems 3130xlジェネティックアナライザ(Life Technologies社製) を用いて決定し、その結果、配列番号1記載のアミノ酸配列の175位のアラニンをシステインに、214位のアスパラギンをシステインに、及び466位のグリシンをアスパラギン酸に置換した変異体であるMpGDH-M1/A175C/N214C/G466D(配列番号5) をコードするDNAコンストラクトを得た(pUC19-MpGDH-M2)(配列番号6)。

[0099] 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。

[0100] 具体的には、MpGDH変異体及びMpGDH-M2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, p973-981) を行い、5'アーム領域~PyrG遺伝子(ウラシル栄養要求性マーカー)~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。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20  $\mu$ g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Czappeck-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。

[0101] 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。

[0102] MpGDH変異体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。

[0103] 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)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.05% (w/v)  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；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まで濃縮し、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変異体及びMpGDH-M2の精製標品を得た。なお、この酵素はその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）。

[0104] 2. *Aspergillus terreus*由来GDH遺伝子の宿主への導入と精製標品の取得

特許第5020070号に記載の*Aspergillus terreus*

s由来GDH (AtGLD) 遺伝子を上記と同様にAspergillus sojaeで発現させた。さらに上記と同様にGDH生産させ、得られた培地上清画分を精製し、AtGLDの精製標品を得た。なお、この酵素はその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)。

[0105] 3. フラビン系化合物を用いたセンサー評価

MpGDH変異体の精製標品と2種のフラビン化合物(リボフラビン(RF)、フラビンモノヌクレオチド(FMN))を用いて、印刷電極測定によるクロノアンペロメトリーを行った。具体的には、グラッシーカーボンの作用電極(2.64 mm<sup>2</sup>)、銀塩化銀の参照電極が印刷されてなる、DEP Chip電極(丸形・カーボン・ダムリング付き; バイオデバイステクノロジー社製)上に、35 mg/mlの精製酵素MpGDH変異体溶液を10 μL載せた。その後、DEP Chip専用コネクターを用いて、ALS 電気化学アナライザー 814D (BAS社製)に接続した。そして、+300 mV (vs. Ag/Ag<sup>+</sup>)の電圧を印加したクロノアンペロメトリーを行った。具体的には、終濃度50 mMのリン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)及び20 mMグルコース、100 μMのRF溶液を10 μL電極上に載せて反応を行い、60秒間の電流値を測定した。同様にして、100 μMのRFの代わりに1 mMのFMNを用いて測定した。また、対照として、RFやFMNを含んでいないグルコース溶液を用いて同様の試験を行った。

[0106] 結果を図4に示す。図4はMpGDH変異体酵素とRFもしくはFMNを混合したクロノアンペロメトリー測定結果である。RFやFMNを混合しなかった場合と比べて、RFやFMNを添加した場合に有意に高い応答電流が見られた。+300 mV (vs. Ag/Ag<sup>+</sup>)の印加電圧で測定開始から60秒後において応答電流がRFやFMNを添加しなかった際は30.6 nAであったが、RFを添加した際には33.5 nAであり、FMNを添加した際には53.2 nAと高い値が示された。

[0107] 続いて、GDH-M2の精製標品を用いて上記と同様の測定を行った。そ

の結果、RFやFMNを混合しなかった場合と比べて、RFやFMNを添加した場合に有意に高い応答電流が見られた。 $+300\text{ mV}$  (vs.  $\text{Ag}/\text{Ag}^+$ ) の印加電圧で測定開始から60秒後において応答電流がRFやFMNを添加しなかった際は $17.5\text{ nA}$ であったが、RFを添加した際には $19.2\text{ nA}$ であり、FMNを添加した際には $19.6\text{ nA}$ と高い値が示された。すなわち、バックグラウンドと比較して、測定可能な応答電流が観測された。

[0108] 続いて、AtGLDの精製標品と4種のフラビン化合物(RF、FMN、ルミクロム(LC)、フラビンアデニンジヌクレオチド(FAD))を用いて、上記と同様に印刷電極測定によるクロノアンペロメトリーを行った。ただし、印加電圧を $+100\text{ mV}$  (vs.  $\text{Ag}/\text{Ag}^+$ ) とし、 $100\text{ }\mu\text{M}$ のRF、 $1\text{ mM}$ のFMN、 $100\text{ }\mu\text{M}$ のLC、 $1\text{ mM}$ のFADをそれぞれ用いた。結果を図1に示す。図1はAtGLD酵素とRFもしくはFMN、LC、FADを混合したクロノアンペロメトリー測定結果である。フラビン化合物を混合しなかった場合と比べて、RFやFMN、LC、FADを添加した場合に有意に高い応答電流が見られた。 $+100\text{ mV}$  (vs.  $\text{Ag}/\text{Ag}^+$ ) の印加電圧で測定開始から60秒後において応答電流がフラビン化合物を添加しなかった際は $1.4\text{ nA}$ であったが、RFを添加した際には $3.3\text{ nA}$ であり、FMNを添加した際には $17.9\text{ nA}$ であり、LCを添加した際には $10.3\text{ nA}$ であり、FADを添加した際には $2.7\text{ nA}$ と高い値が示された。すなわち、バックグラウンドと比較して、測定可能な応答電流が観測された。なお、グルコース未添加でフラビン化合物を混合した場合はいずれも、 $1.4\text{ nA}$ より応答電流は下回った。

[0109] 続いて、Glucose Dehydrogenase (FAD-dependent) (BBI社製、Product Code: GLD1、以下GLD1と表記する) と4種のフラビン化合物(RF、FMN、LC、FAD)を用いて、上記と同様に印刷電極測定によるクロノアンペロメトリーを行った。なお、これらのGDHも、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）。ただし、印加電圧を $+100\text{ mV}$ （ $\text{vs. Ag/Ag}^+$ ）とした。結果を図2に示す。図2はGLD1酵素とRFもしくはFMN、LC、FADを混合したクロノアンペロメトリー測定結果である。フラビン化合物を混合しなかった場合と比べて、RFやFMN、LC、FADを添加した場合に有意に高い応答電流が見られた。 $+100\text{ mV}$ （ $\text{vs. Ag/Ag}^+$ ）の印加電圧で測定開始から60秒後において応答電流がフラビン化合物を添加しなかった際は $1.1\text{ nA}$ であったが、RFを添加した際には $2.1\text{ nA}$ であり、FMNを添加した際には $30.8\text{ nA}$ であり、LCを添加した際には $3.5\text{ nA}$ であり、FADを添加した際には $5.7\text{ nA}$ と高い値が示された。すなわち、バックグラウンドと比較して、測定可能な応答電流が観測された。

[0110] 続いて、Glucose Oxidase（東洋紡社製、Product Code: GLO-201、以下GODと表記する）と2種のフラビン化合物（RF、FMN）を用いて、上記と同様に印刷電極測定によるクロノアンペロメトリーを行った。なお、これらのGDHも、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）。ただし、印刷電極はカーボンの作用電極（ $12.6\text{ mm}^2$ ）、銀の参照電極が印刷されてなる、SCREEN-PRINTED ELECTRODES（Drop Sense社製、DRP-110）を用い、専用コネクタ（Drop Sense社製、DRP-CAC）を用いて、ALS 電気化学アナライザー814D（BAS社製）に接続した。そして、印加電圧を $+100\text{ mV}$ （ $\text{vs. Ag/Ag}^+$ ）とした。結果を図3に示す。図3はGOD酵素とRFもしくはFMNを混合したクロノアンペロメトリー測定結果である。フラビン化合物を混合しなかった場合と比べて、RFやFMNを添加した場合に有意に高い応答電流が見られた。 $+100\text{ mV}$ （ $\text{vs. Ag/Ag}^+$ ）の印加電圧で測定開始から60秒後において応答電流がフラビン化合物を添加しなかった際は $9.8\text{ nA}$ であったが、RFを添加した際には $25.0\text{ nA}$ であり、FMNを添加した際には $31.6\text{ nA}$ と高い値が示された。すなわち、バ

ックグラウンドと比較して、測定可能な応答電流が観測された。

[0111] 以上のように、フラビン系化合物を用いると、GDHやGODがグルコースと反応した際に得られる応答電流が高められ、感度よくグルコースを測定できるといえる。また、応答電流がグルコース濃度に依存していることから、濃度既知のグルコース含有サンプルに基づく応答電流を予め測定して検量線を作成しておき、濃度未知のグルコース含有サンプルの応答電流を測定し、当該検量線から、グルコース濃度を測定することができる。なお、上記はあくまで例証であり、本発明はこれに何ら限定されない。例えば、より大きな応答電流が好ましい場合には、電極面積、例えば作用極の面積をスケールアップすることができる。

[0112] 以上より、フラビン化合物不在下の場合と比較して、本発明のフラビン化合物の存在下で応答電流の増大が観察されたことから、本発明の遊離型フラビン化合物は、メディエーターとして機能し、GOD又はGDHがグルコースをグルコノラクトンへ酸化するときに、電子の受け渡しを媒介していることが裏付けられた。フラビン化合物の酸化還元電位は知られており、相手化合物の酸化還元電位次第で電子の授受が可能であることは知られているが、実際にフラビン化合物をGDHやGODと混合してグルコースを測定した例はこれまで報告されていない。

[0113] [実施例2]

電気化学的測定におけるグルコース濃度依存性の確認

35 mg/mlのGLD1溶液を2  $\mu$ L、1.5 Mの塩化カリウムを含有した20 mMのリン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)を3  $\mu$ L、さらに1 mMのFMNを5  $\mu$ L、DEP Chip電極に混合して載せた。そして、-400 mVから+200 mV (vs. Ag/AgCl)の範囲で電圧を掃引したサイクリックボルタンメトリーを行った。掃引速度は10 mV/secで行った。続いて、種々のグルコース濃度になるように2 Mグルコース溶液を添加し、同様にサイクリックボルタンメトリーを行った。ある特定電位における酸化電流値( $I_o$ )と還元電流値( $I_R$ )を足して2で割った値を算出し

、この算出値がグルコース濃度依存的に増加するか調べた。一般的に、ある特定電位で印加したクロノアンペロメトリーにて一定の応答電流となった際の値が基質濃度依存的に増加すれば、サイクリックボルタンメトリーにおける先と同じ電位における $(I_O + I_R) / 2$ の値も同様に増加し、連動することが知られている。

[0114] GLD1とFMNを混合して測定し、グルコース濃度と $(I_O + I_R) / 2$ 値をプロットした結果を図5に示す。その結果、 $+100\text{ mV}$  (vs.  $\text{Ag} / \text{AgCl}$ ) においてグルコース濃度依存的に $(I_O + I_R) / 2$ 値も増加していることが確認され、FMNがメディエータとして機能していることが分かった。さらに、 $-100\text{ mV}$  (vs.  $\text{Ag} / \text{AgCl}$ ) においてもグルコース濃度依存的に $(I_O + I_R) / 2$ 値も増加していることが確認された。

[0115] なお、本発明のフラビン化合物の代わりに、従来の人工電子メディエーターを用いて上記の条件で応答電流を測定しても、応答電流は観測されないと考えられる。なぜならば、従来の人工電子メディエーターは酸化還元電位が本発明のフラビン化合物のそれと異なり、たとえばフェリシアン化カリウムは、酸化還元電位が $250\text{ mV}$ 前後である。そうすると、フェリシアン化カリウムをメディエーターとして用いても $100\text{ mV}$ 程度の印加電位では応答電流は流れず、応答電流を観察するには約 $350\text{ mV}$ 以上の電位を印加する必要があると考えられる。ところが本発明の化合物では、 $+100\text{ mV}$ という低電位でも応答電流が観察された。これは種々の用途において有利となるものである。

[0116] 続いて上記と同様に、MpGDH-M2とFMNを混合し、 $-400\text{ mV}$ から $+200\text{ mV}$  (vs.  $\text{Ag} / \text{AgCl}$ ) の範囲で電圧を掃引したサイクリックボルタンメトリーを行った。グルコース濃度と $(I_O + I_R) / 2$ 値をプロットした結果を図6に示す。その結果、 $+100\text{ mV}$  (vs.  $\text{Ag} / \text{AgCl}$ ) においてグルコース濃度依存的に $(I_O + I_R) / 2$ 値も増加していることが確認され、FMNがメディエータとして機能していることが分かった。

[0117] 続いて、 $35\text{ mg} / \text{ml}$ のGLD1溶液を $2\text{ }\mu\text{L}$ 、 $1.5\text{ M}$ の塩化カリウ

ムを含有した20 mMのリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を3  $\mu$ L、さらに1 mMのFADを5  $\mu$ L、DEP Chip電極に混合して載せた。そして、0 mVから+600 mV (vs. Ag/AgCl) の範囲で電圧を掃引したサイクリックボルタンメトリーを行った。掃引速度は10 mV/secで行った。続いて、種々のグルコース濃度になるように2 Mグルコース溶液を添加し、同様にサイクリックボルタンメトリーを行った。GLD1とFADを混合して測定し、グルコース濃度と $(I_o + I_R) / 2$ 値をプロットした結果を図7に示す。その結果、+100 mV (vs. Ag/AgCl) においてグルコース濃度依存的に $(I_o + I_R) / 2$ 値も増加していることが確認され、FADがメディエータとして機能していることが分かった。

[0118] 続いて、35 mg/mlのMpGDH-M2溶液を2  $\mu$ L、1.5 Mの塩化カリウムを含有した20 mMのリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を3  $\mu$ L、さらに100  $\mu$ MのRFを5  $\mu$ L、DEP Chip電極に混合して載せた。そして、0 mVから+600 mV (vs. Ag/AgCl) の範囲で電圧を掃引したサイクリックボルタンメトリーを行った。掃引速度は10 mV/secで行った。続いて、種々のグルコース濃度になるように2 Mグルコース溶液を添加し、同様にサイクリックボルタンメトリーを行った。MpGDH-M2とRFを混合して測定し、グルコース濃度と $(I_o + I_R) / 2$ 値をプロットした結果を図8に示す。その結果、+500 mV (vs. Ag/AgCl) においてグルコース濃度依存的に $(I_o + I_R) / 2$ 値も増加していることが確認され、FADがメディエータとして機能していることが分かった。さらに、+400 mV (vs. Ag/AgCl) においても同様にグルコース濃度依存性が確認された。

[0119] 続いて、35 mg/mlのGLD1溶液を2  $\mu$ L、1.5 Mの塩化カリウムを含有した20 mMのリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を3  $\mu$ L、さらに100  $\mu$ MのLCを5  $\mu$ L、DEP Chip電極に混合して載せた。そして、0 mVから+600 mV (vs. Ag/AgCl) の範囲で電圧を掃引したサイクリックボルタンメトリーを行った。掃引速度は10 mV/sec

secで行った。続いて、種々のグルコース濃度になるように2 Mグルコース溶液を添加し、同様にサイクリックボルタンメトリーを行った。GLD1とLCを混合して測定し、グルコース濃度と $(I_O + I_R) / 2$ 値をプロットした結果を図9に示す。その結果、+500 mV (vs. Ag/AgCl)においてグルコース濃度依存的に $(I_O + I_R) / 2$ 値も増加していることが確認され、LCがメディエータとして機能していることが分かった。

[0120] またルテニウム錯体とFMNを組み合わせた際の効果を確認した。35 mg/mlのGLD1溶液を2  $\mu$ L、1.5 Mの塩化カリウムを含有した20 mMのリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を3  $\mu$ L、さらに100  $\mu$ Mのヘキサアンミンルテニウムを2.5  $\mu$ L、1 mMのFMNを2.5  $\mu$ L、DEP Chip電極に混合して載せた。そして、-400 mVから+200 mV (vs. Ag/AgCl)の範囲で電圧を掃引したサイクリックボルタンメトリーを行った。掃引速度は10 mV/secで行った。続いて、18 mMのグルコース濃度になるように2 Mグルコース溶液を添加し、同様にサイクリックボルタンメトリーを行った。比較として、同様の濃度でヘキサアンミンルテニウム単独、FMN単独で試験を行った。その結果、GLD1とヘキサアンミンルテニウムを混合して測定し、18 mMグルコースを添加した際の0 Vにおける $(I_O + I_R) / 2$ 値は2 nAであった。GLD1とFMNを混合して測定し、18 mMグルコースを添加した際の $(I_O + I_R) / 2$ 値は3 nAであった。GLD1とヘキサアンミンルテニウム、FMNを混合して測定し、18 mMグルコースを添加した際の $(I_O + I_R) / 2$ 値は11 nAであり、相乗的な応答電流の増加を確認することができた。なお、いずれの場合においてもグルコース未添加時における $(I_O + I_R) / 2$ 値は0~1 nAの範囲内であった。

[0121] なお、数nAの感度があれば十分に電気化学的測定装置でグルコースを検出できるため、上記測定により、検量線を作成すれば濃度未知のグルコースを含みうるサンプルに関し、含有されるグルコースを検出することが可能である。したがって、実施例1においてグルコース添加時にグルコースが無い

時と比較して応答電流が僅かでも向上した場合、さらにグルコースを添加した際に応答電流も向上するといえる。

[0122] [実施例3]

1. 燃料電池の構築

精製GDHをカーボン電極にグルタルアルデヒドによる架橋固定化することでアノード電極を作製する。また、ビリルビンオキシダーゼ（BOD、天野エンザイム社製）を多孔質カーボン電極に固定化することでカソード電極を作製する。アノード電極とカソード電極との間に固体高分子電解質膜としてナフィオン膜を挟んだ、バイオ電池を構築する。また、アノード電極とカソード電極を結ぶ配線の間に、一定の負荷抵抗と電圧計をそれぞれ直列と並列に挿入する。アノード側には、1M リン酸カリウム緩衝液（pH 7.0）、10mM FMN、400mM D-グルコースを含む電解質溶液を入れ、グルコースを供給し、30℃、pH 7の条件で作動させ、電流が流れるようにする。

[0123] 特定の理論に拘束されることを望むものではないが、本発明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1において100mVという低電位を印加した場合にも、本発明の化合物の存在下では応答電流が観察された。したがって例えば酸素を用いる燃料電池であれば、酸素の酸化還元電位から100mVを減算した大きな起電力が期待される。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**

[0124] 本発明のフラビン化合物または本発明のフラビン化合物を含む組成物を用いることにより、毒性の低い又は毒性のないメディエーターにより、グルコース測定を行うことができる。これは例えば、体内埋め込み型の連続グルコース測定に用いることができる。またこれはグルコース燃料電池に使用しうる。

[0125] 本明細書で言及又は引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

[0126] 配列の簡単な説明

配列番号 1 *Mucor prainii* 由来 GDH のアミノ酸配列

配列番号 2 *Mucor prainii* 由来 GDH の核酸配列

配列番号 3 MpGDH-M1 (aa)

配列番号 4 MpGDH-M1 (DNA)

配列番号 5 MpGDH-M2 (aa)

配列番号 6 MpGDH-M2 (DNA)

配列番号 7 - 1 2 プライマー

[0127] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

## 請求の範囲

[請求項1] 遊離型のフラビン化合物を含み、精製されたFAD依存性グルコースオキシダーゼ又は精製されたFAD依存性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、  
ただし該組成物は、

- (i) 外部から添加される、単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることのできる、人工電子メディエーターを含まない、
  - (ii) 外部から添加される、単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることのできる、非水溶性の電子メディエーターを含まない、又は
  - (iii) 外部から添加される、単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることのできる、酸化還元電位が0.3V以上の電子メディエーターを含まない、
- 前記グルコース測定用組成物。

[請求項2] 遊離型のフラビン化合物を含み、精製されたFAD依存性グルコースオキシダーゼ又は精製されたFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼを含む、アノード電極、  
ただし該電極は、

- (i) 外部から添加される、単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることのできる、人工電子メディエーターを含まない、
- (ii) 外部から添加される、単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることのできる、非水溶性の電子メディエーターを含まない、又は
- (iii) 外部から添加される、単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け

取ることのできる、酸化還元電位が0.3 V以上の電子メディエーターを含まない、

前記アノード電極。

[請求項3] 請求項2に記載のアノード電極、カソード電極、及び、グルコースを含む燃料槽を有する、グルコース燃料電池。

[請求項4] 遊離型のフラビン化合物及び、精製されたFAD依存性グルコースオキシダーゼ又は精製されたFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼを有する、グルコースセンサー、  
ただし該センサーは、

(i) 外部から添加される、人工電子メディエーターを含まない、

(ii) 外部から添加される、非水溶性の電子メディエーターを含まない、又は

(iii) 外部から添加される、酸化還元電位が0.3 V以上の電子メディエーターを含まない、

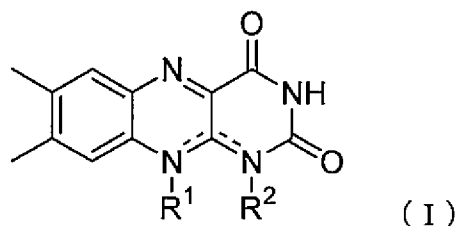
前記センサー。

[請求項5] 該フラビン化合物が固相中に固定化されている非酵素型のフラビン化合物である、請求項2に記載の電極、請求項3に記載の電池又は請求項4に記載のセンサー。

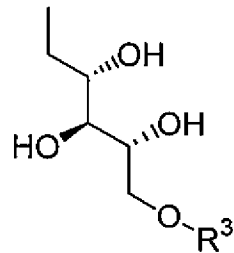
[請求項6] 精製されたFAD依存性グルコースオキシダーゼ又は精製されたFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼが固相中に固定化されている、請求項2又は5に記載の電極、請求項3又は5に記載の電池或いは請求項4又は5に記載のセンサー。

[請求項7] フラビン化合物が以下の化学式 (I)

[化1]



[式中、 $R^1$ は存在しないか又は $-CH_3$ 、若しくは  
[化2]

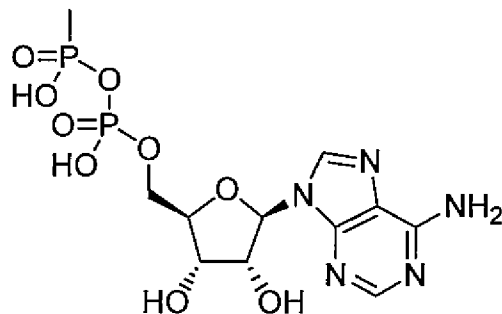


であり、 $R^1$ が存在しない場合には、 $R^1$ が連結して描かれている窒素原子は隣接炭素原子との間に二重結合を形成しておりかつ $R^2$ はHであり、

$R^2$ は存在しないか、又はHであり、 $R^2$ が存在しない場合には、 $R^2$ が連結して描かれている窒素原子は隣接炭素原子との間に二重結合を形成しており、

$R^3$ は、H、リン酸基、又は

[化3]



である]

で表される化合物である、請求項1に記載の組成物、請求項2、5若しくは6に記載の電極、請求項3、5若しくは6に記載の電池又は請求項4、5若しくは6に記載のセンサー。

[請求項8]

フラビン化合物が、フラビンモノヌクレオチド、リボフラビン、ルミクロム、フラビンアデニンジヌクレオチド又はルミフラビンである、請求項1若しくは7に記載の組成物、請求項2、5、6若しくは7

に記載の電極、請求項 3、5、6 若しくは 7 に記載の電池又は請求項 4、5、6 若しくは 7 に記載のセンサー。

[請求項9]

前記(i)において、人工電子メディエーターが、キノン類、フェナジン類、ピオロゲン類、シトクロム類、チオレドキシン類、フェノキサジン類、フェノチアジン類、フェリシアン化物、フェレドキシン類、フェロセン、フェロセン誘導体、及び金属錯体である、

前記(ii)において、非水溶性の電子メディエーターがフェロセン、非水溶性のキノン類、非水溶性のフェナジン類、非水溶性のピオロゲン類、非水溶性のチオレドキシン類、非水溶性のフェノキサジン類、非水溶性のフェノチアジン類、非水溶性のフェレドキシン類、及び非水溶性のフェロセン誘導体である、又は

前記(iii)において、さらに、酸化還元電位が0.2 V以上の電子メディエーターを含まない、

請求項 1、7 若しくは 8 に記載の組成物、請求項 2、5、6、7 若しくは 8 に記載の電極、請求項 3、5、6、7 若しくは 8 に記載の電池又は請求項 4、5、6、7 若しくは 8 に記載のセンサー。

[請求項10]

グルコースを含みうる試料と、遊離型のフラビン化合物と、精製されたFAD依存性グルコースオキシダーゼ又は精製されたFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼとを接触させる工程、及び電流を測定する工程を含む、グルコースの電気化学的測定方法、  
ただし該方法は、

(i) 単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることのできる人工電子メディエーターを外部から添加しない、

(ii) 単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることのできる非水溶性の電子メディエーターを外部から添加しない、又は

(iii) 単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD

D依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることのできる、酸化還元電位が0.3 V以上の電子メディエーターを外部から添加しない、

前記方法。

[請求項11] 遊離型のフラビン化合物を電子メディエーターとして用いる発電方法であって、アノード及びカソードを使用し、

電解質に接触しているアノードにフラビン化合物を供給し、グルコース燃料を供給する工程を有し、

該アノードが、精製されたFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼ又は精製されたFAD依存性グルコースオキシダーゼを有する電極である、該発電方法、

ただし該方法は、

(i) 単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることのできる人工電子メディエーターを外部から添加しない、

(ii) 単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることのできる非水溶性の電子メディエーターを外部から添加しない、又は

(iii) 単独で電子をFAD依存性グルコースオキシダーゼ又はFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼから受け取ることのできる、酸化還元電位が0.3 V以上の電子メディエーターを外部から添加しない、

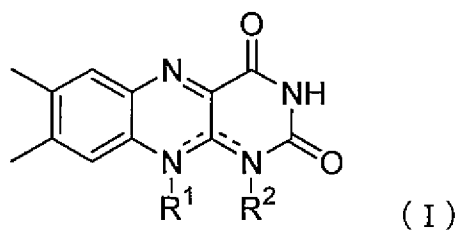
前記方法。

[請求項12] 該フラビン化合物が固相中に固定化されている非酵素型のフラビン化合物である、請求項10又は11に記載の方法。

[請求項13] 精製されたFAD依存性グルコースオキシダーゼ又は精製されたFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼが固相中に固定化されている、請求項10～12のいずれか1項に記載の方法。

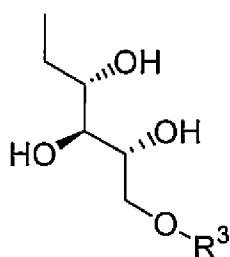
[請求項14] フラビン化合物が以下の化学式 (I)

[化4]



[式中、R<sup>1</sup>は存在しないか又は－CH<sub>3</sub>、若しくは

[化5]

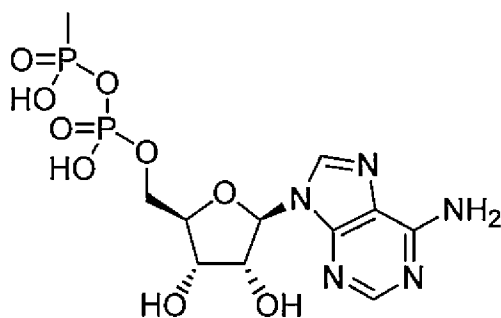


であり、R<sup>1</sup>が存在しない場合には、R<sup>1</sup>が連結して描かれている窒素原子は隣接炭素原子との間に二重結合を形成しておりかつR<sup>2</sup>はHであり、

R<sup>2</sup>は存在しないか、又はHであり、R<sup>2</sup>が存在しない場合には、R<sup>2</sup>が連結して描かれている窒素原子は隣接炭素原子との間に二重結合を形成しており、

R<sup>3</sup>は、H、リン酸基、又は

[化6]



である]

で表される化合物である、請求項10～13のいずれか1項に記載の方法。

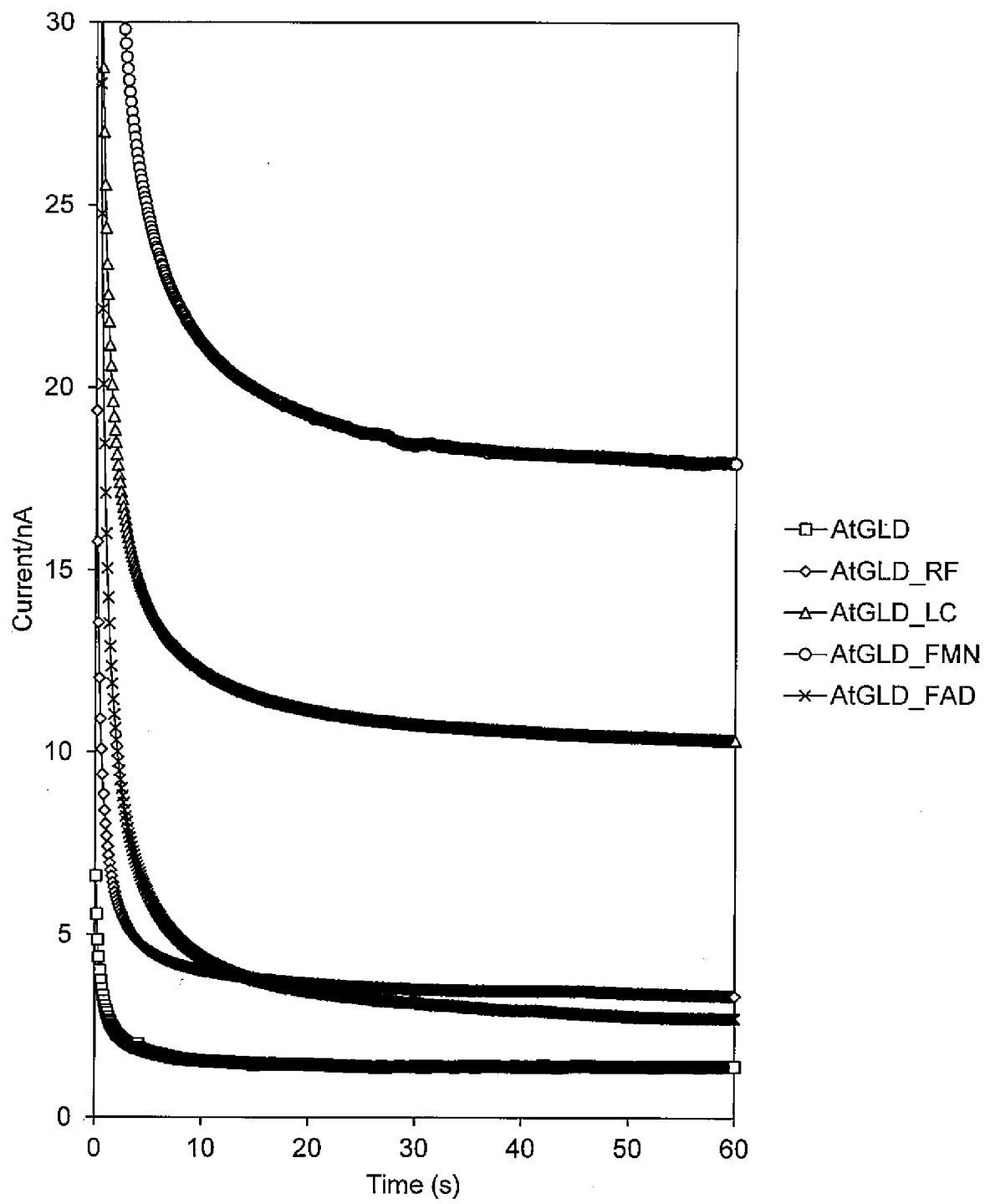
[請求項15] フラビン化合物が、フラビンモノヌクレオチド、リボフラビン、ルミクロム、フラビンアデニンジヌクレオチド又はルミフラビンである、請求項10～14のいずれか1項に記載の方法。

[請求項16] 前記(i)において、人工電子メディエーターが、キノン類、フェナジン類、ビオロゲン類、シトクロム類、チオレドキシン類、フェノキサジン類、フェノチアジン類、フェリシアン化物、フェレドキシン類、フェロセン、フェロセン誘導体、及び金属錯体である、

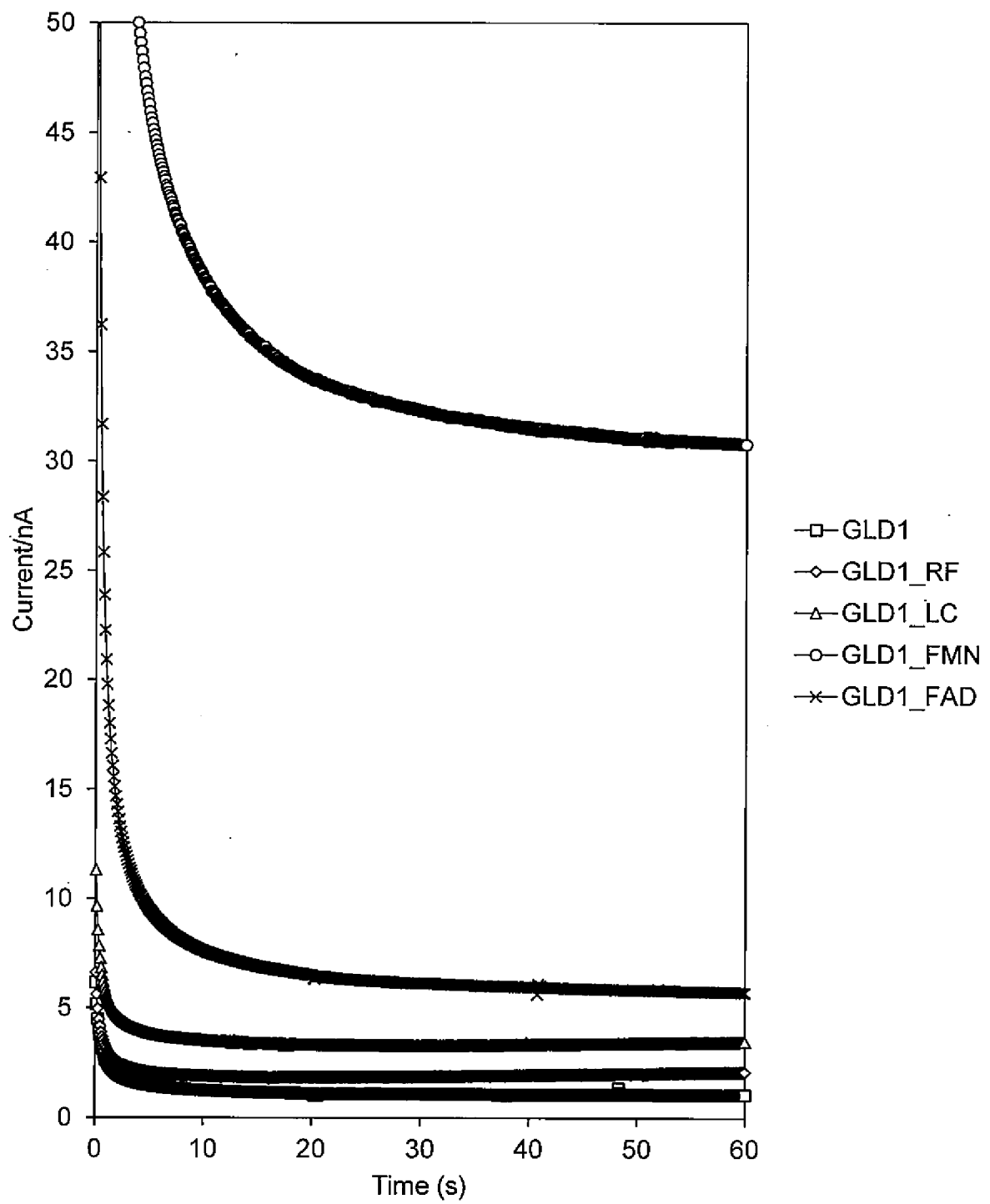
前記(ii)において、非水溶性の電子メディエーターがフェロセン、非水溶性のキノン類、非水溶性のフェナジン類、非水溶性のビオロゲン類、非水溶性のチオレドキシン類、非水溶性のフェノキサジン類、非水溶性のフェノチアジン類、非水溶性のフェレドキシン類、及び非水溶性のフェロセン誘導体である、又は

前記(iii)において、さらに、酸化還元電位が0.2V以上の電子メディエーターを外部から添加しない、  
請求項10～15のいずれか1項に記載の方法。

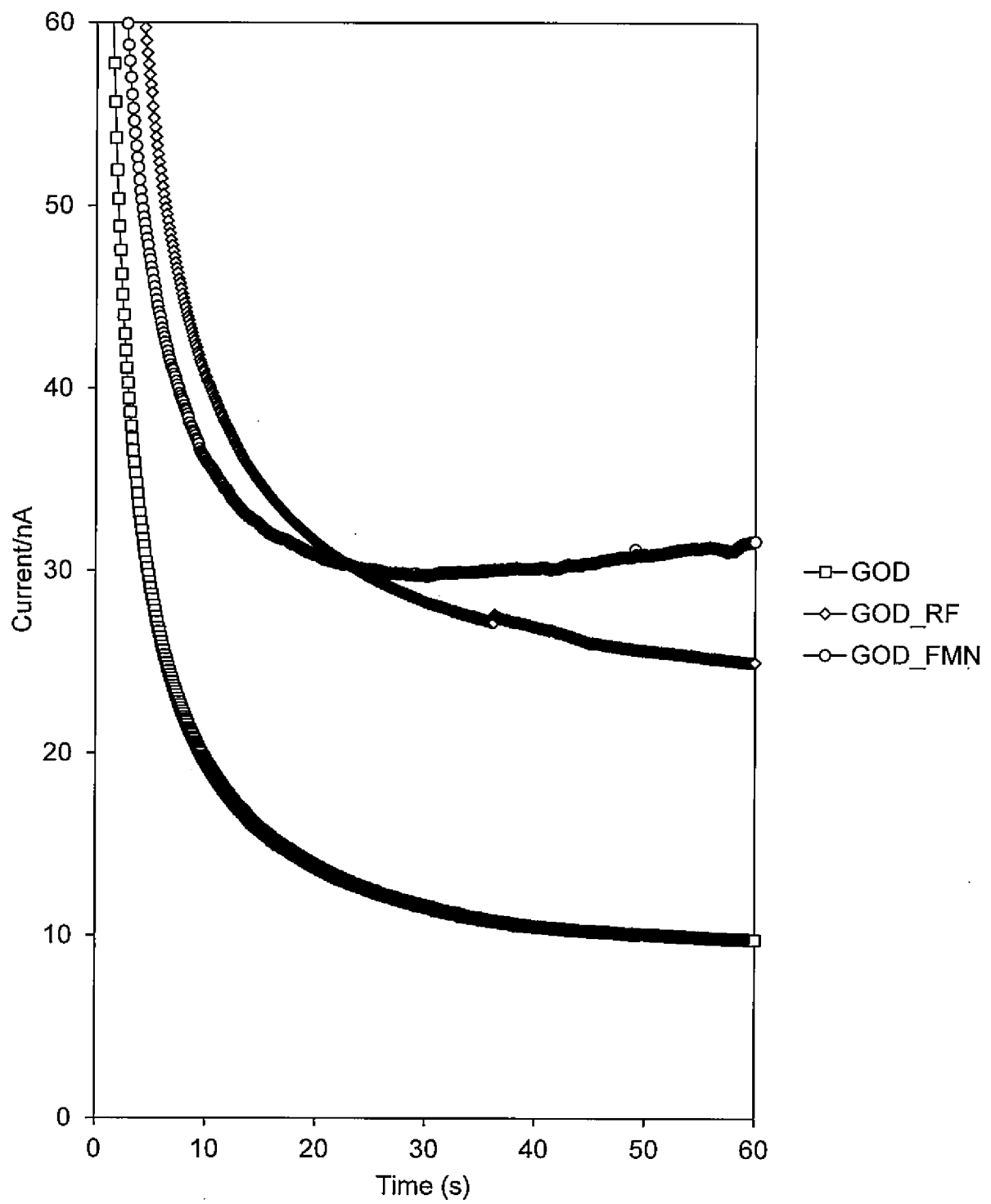
[図1]



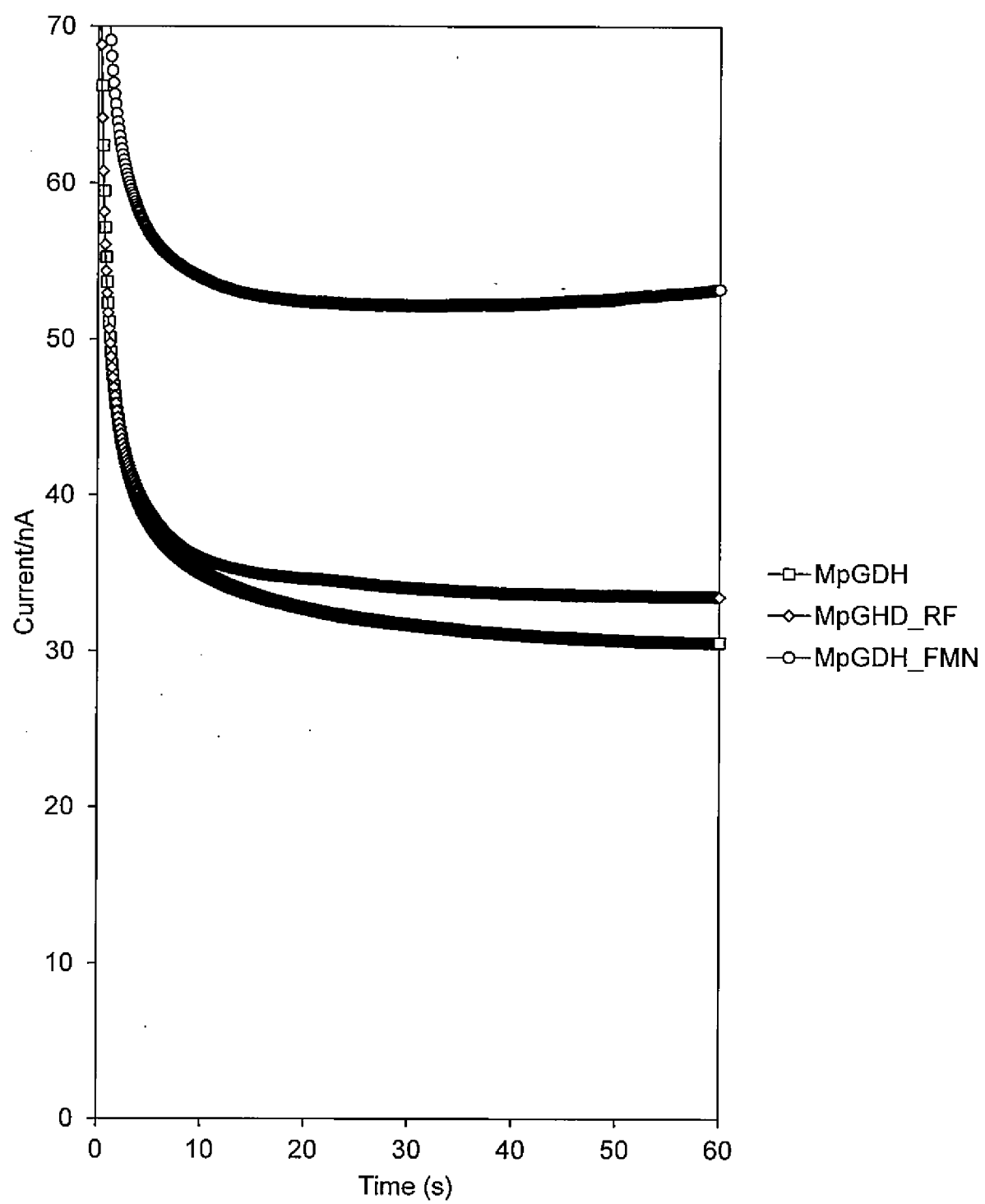
[図2]



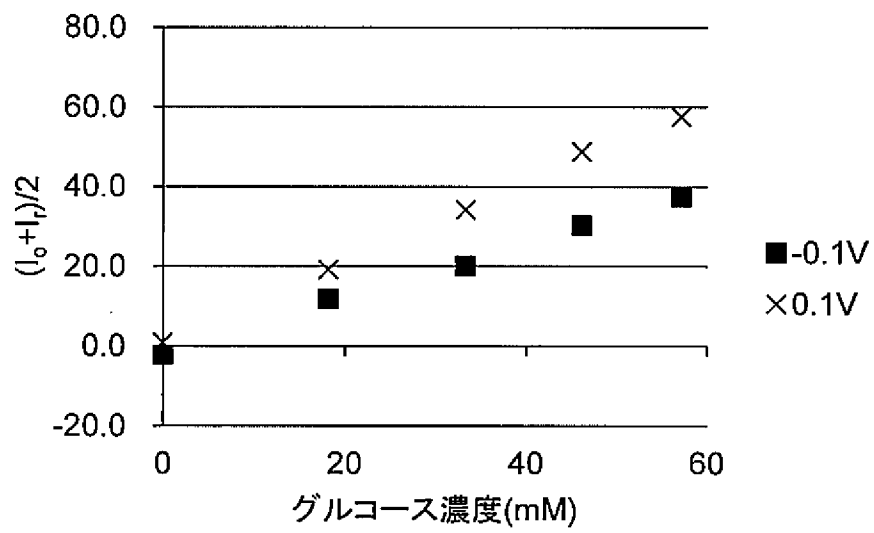
[図3]



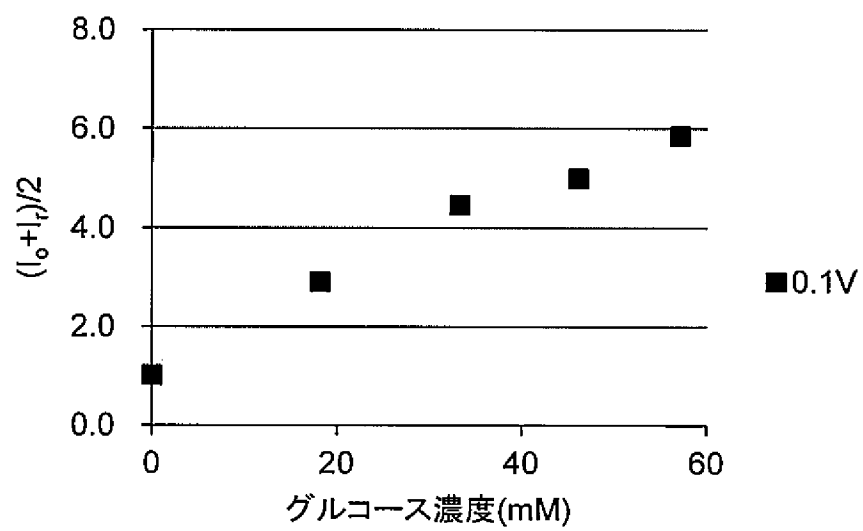
[図4]



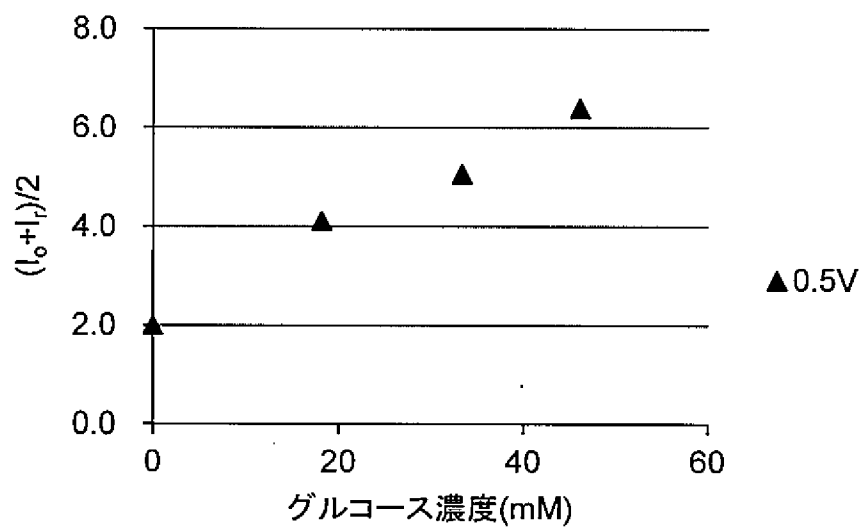
[図5]



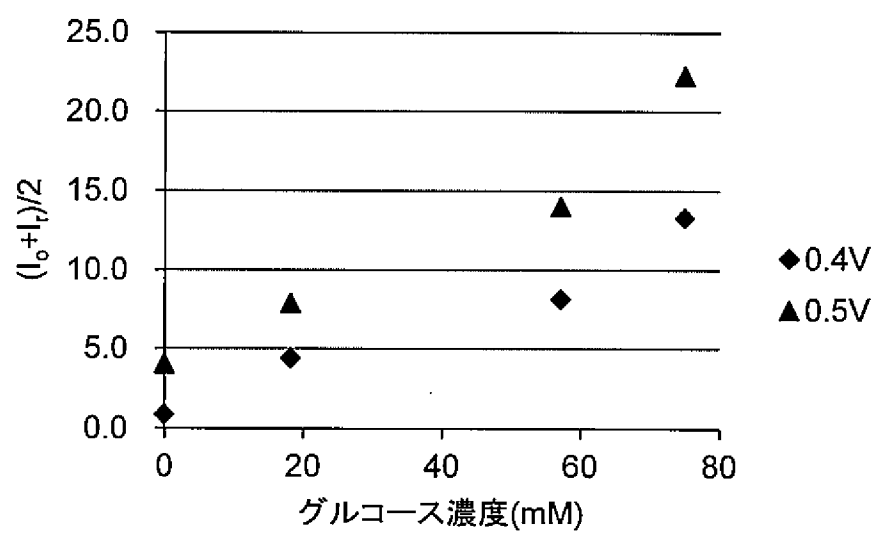
[図6]



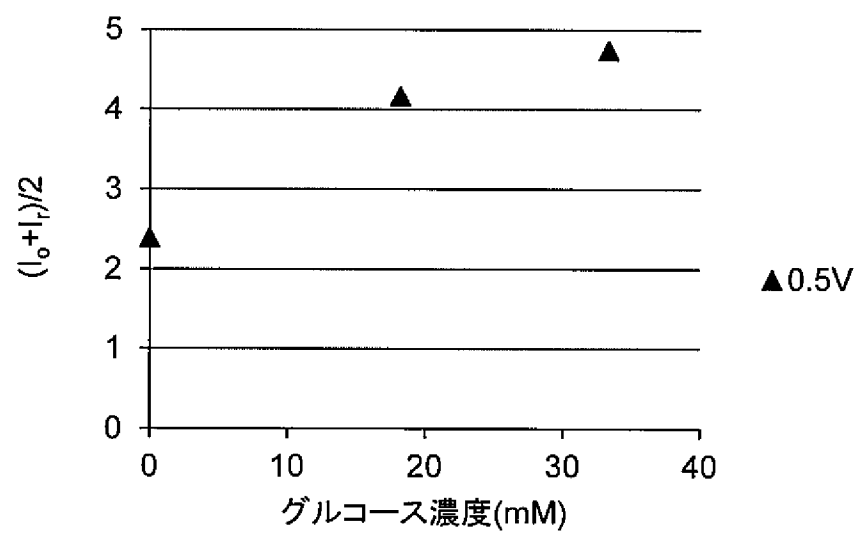
[図7]



[図8]



[図9]



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/037851

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C12Q1/26(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)i, C12Q1/32(2006.01)i,  
C12Q1/54(2006.01)i, G01N27/327(2006.01)i, H01M4/90(2006.01)i,  
H01M8/16(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)

Int.Cl. C12Q1/00-3/00, C12M1/00-3/10, G01N27/26-27/49, H01M4/90, H01M8/16

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 | 1971-2018 |
| Registered utility model specifications of Japan         | 1996-2018 |
| Published registered utility model applications of Japan | 1994-2018 |

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                  | Relevant to claim No. |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | JP 2006-234788 A (CANON INC.) 07 September 2006,<br>examples 23, 196, 197, tables 1, 2, 11<br>& US 2008/0248354 A1, examples 23, 196, 197, tables<br>1, 2, 4<br>& WO 2006/009324 A1 | 1-16                  |



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

05 January 2018

Date of mailing of the international search report

16 January 2018

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/JP2017/037851

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                      | Relevant to claim No. |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | JP 6-242068 A (NEC CORPORATION) 02 September 1994, paragraphs [0002], [0014]-[0020], fig. 1, 3 & US 5445920 A, column 1, lines 15-20, column 6, line 25 to column 8, line 68, fig. 1, 3 | 1-2, 4-10             |
| X         | JP 2009-150658 A (TDK CORPORATION) 09 July 2009, paragraph [0029], example 7 (Family: none)                                                                                             | 1-2, 4-10             |
| X         | JP 2009-168622 A (TDK CORPORATION) 30 July 2009, paragraph [0037], example 1 (Family: none)                                                                                             | 1-2, 4-10             |
| X         | JP 2004-296099 A (FUJIFILM CORPORATION) 21 October 2004, examples 1-3 (Family: none)                                                                                                    | 2-3, 5-9, 11-16       |

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12Q1/26(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)i, C12Q1/32(2006.01)i, C12Q1/54(2006.01)i,  
G01N27/327(2006.01)i, H01M4/90(2006.01)i, H01M8/16(2006.01)i

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12Q1/00-3/00, C12M1/00-3/10, G01N27/26-27/49, H01M4/90, H01M8/16

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 | 1971-2018年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1996-2018年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1994-2018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), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>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<br>請求項の番号 |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| X               | JP 2006-234788 A (キャノン株式会社) 2006.09.07,<br>実施例23、196、197、表1、2、11<br>& US 2008/0248354 A1、Example 23、196、197、<br>TABLE 1、2、4<br>& WO 2006/009324 A1 | 1-16           |

☒ 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                                 | 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの     |
| 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの                         | 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの                     |
| 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) | 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの |
| 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献                                      | 「&」 同一パテントファミリー文献                                                   |
| 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願                                   |                                                                     |

国際調査を完了した日

05.01.2018

国際調査報告の発送日

16.01.2018

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

西 賢二

4N

5803

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

## C (続き) . 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>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<br>請求項の番号  |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| X               | JP 6-242068 A (日本電気株式会社) 1994. 09. 02,<br>段落 [0002]、[0014] – [0020]、図1、3<br>& US 5445920 A、第1欄第15 – 20行、第6欄第25行 – 第8欄<br>第68行、図1、3 | 1-2, 4-10       |
| X               | JP 2009-150658 A (TDK株式会社) 2009. 07. 09,<br>段落 [0029]、実施例7<br>(ファミリーなし)                                                            | 1-2, 4-10       |
| X               | JP 2009-168622 A (TDK株式会社) 2009. 07. 30,<br>段落 [0037]、実施例1<br>(ファミリーなし)                                                            | 1-2, 4-10       |
| X               | JP 2004-296099 A (富士写真フイルム株式会社) 2004. 10. 21,<br>実施例1 – 3<br>(ファミリーなし)                                                             | 2-3, 5-9, 11-16 |