

(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
2014年3月27日(27.03.2014)



(10) 国際公開番号

WO 2014/045912 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01) C12N 9/04 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) C12Q 1/32 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) H01M 4/90 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) H01M 8/16 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/074199
- (22) 国際出願日: 2013年9月9日(09.09.2013)
- (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 2012-204507 2012年9月18日(18.09.2012) JP
特願 2013-113074 2013年5月29日(29.05.2013) JP
- (71) 出願人: 独立行政法人産業技術総合研究所(NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関一丁目3番1号 Tokyo (JP). 株式会社村田製作所(MURATA MANUFACTURING CO., LTD.) [JP/JP]; 〒6178555 京都府長岡京市東神足1丁目10番1号 Kyoto (JP).
- (72) 発明者: 小澤 一道(OZAWA, Kazumichi); 〒3058564 茨城県つくば市並木1-2-1 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 佐々

木 典子(SASAKI, Noriko); 〒3058564 茨城県つくば市並木1-2-1 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 平塚 淳典(HIRATSUKA, Atsunori); 〒3058564 茨城県つくば市並木1-2-1 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 横山 憲二(YOKOYAMA, Kenji); 〒3058564 茨城県つくば市並木1-2-1 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 木下 菜央(KINOSHITA, Nao); 〒3058564 茨城県つくば市並木1-2-1 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 大江 秀明(OOE, Hideaki); 〒6178555 京都府長岡京市東神足1丁目10番1号 株式会社村田製作所内 Kyoto (JP). ▲高▼木 純(TAKAGI, Jun); 〒6178555 京都府長岡京市東神足1丁目10番1号 株式会社村田製作所内 Kyoto (JP). 田中 功二(TANAKA, Koji); 〒6178555 京都府長岡京市東神足1丁目10番1号 株式会社村田製作所内 Kyoto (JP). 小谷 勝重(KOTANI, Katsushige); 〒6178555 京都府長岡京市東神足1丁目10番1号 株式会社村田製作所内 Kyoto (JP).

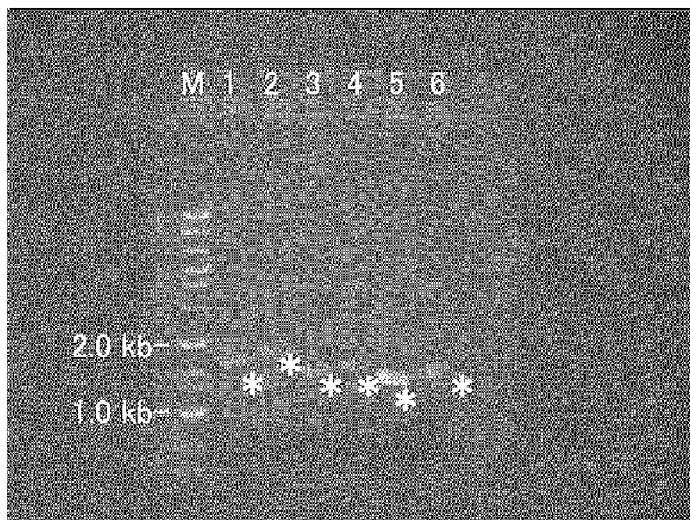
- (74) 代理人: 特許業務法人深見特許事務所(FUKAMI PATENT OFFICE, P.C.); 〒5300005 大阪府大阪市北区中之島二丁目2番7号 中之島セントラルタワー Osaka (JP).

[続葉有]

(54) Title: PROTEIN HAVING FLAVIN ADENINE DINUCLEOTIDE-DEPENDENT GLUCOSE DEHYDROGENASE ACTIVITY

(54) 発明の名称: フラビンアデニンジヌクレオチド依存型グルコース脱水素酵素活性を有するタンパク質

FIG.1



Ta. emersonii (NBRC31232)

(57) Abstract: The present invention is a thermophilic filamentous fungus-derived protein having flavin adenine dinucleotide-dependent glucose dehydrogenase activity. The present invention provides an enzyme for glucose measurement that has better thermal stability than the conventional art while being unaffected by soluble oxygen, not requiring the addition of a co-enzyme, and maintaining the excellent properties of FADGDH in terms of having excellent matrix specificity (particularly low reactivity with maltose).

(57) 要約: 本発明は、好熱性糸状菌由来のタンパク質であって、フラビンアデニンジヌクレオチド依存性グルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質である。本発明は、溶存酸素の影響を受けず、補酵素の添加も必要なく、そして、基質特異性(特にマルトースに対する作用性が低いこと)にも優れているというFADGDHの優れた特性を保ちつつ、従来よりもさらに熱安定性に優れた、グルコース測定用の酵素を提供す



- (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, 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, 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, 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：

フラビンアデニンジヌクレオチド依存型グルコース脱水素酵素活性を有するタンパク質

技術分野

[0001] 本発明は、フラビンアデニンジヌクレオチド依存型グルコース脱水素酵素活性を有するタンパク質、該タンパク質をコードする遺伝子、該遺伝子を含む組換えベクター、該遺伝子を含む形質転換体、上記遺伝子または上記形質転換体を用いたフラビンアデニンジヌクレオチド依存型グルコース脱水素酵素の製造方法、ならびに、上記タンパク質を用いたグルコースセンサ、グルコース濃度測定方法およびバイオ燃料電池に関する。

背景技術

[0002] 血糖自己測定は、糖尿病患者が通常の自分の血糖値を把握し治療に生かすために重要である。血糖自己測定に用いられるセンサには、グルコースを基質とする酵素が利用されている。そのような酵素の従来例としては、グルコースオキシダーゼ（EC 1. 1. 3. 4）が挙げられる。グルコースオキシダーゼは、血糖センサ用酵素として古くから利用されているが、その理由は、グルコースに対する特異性が高く、熱安定性に優れているという利点を有しているからである。

[0003] グルコースオキシダーゼを利用した血糖センサにおいて、グルコースの測定は、グルコースを酸化してD-グルコノ-1, 5-ラクトンに変換する過程で生じる電子がメディエーターを介して電極に渡されることによってなされる。しかし、グルコースオキシダーゼは反応で生じたプロトンに酸素を還元しやすいため、溶存酸素が測定値に影響してしまうという問題があった。

[0004] このような問題を回避するために、例えば、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）依存性またはニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸（NADP）依存性のグルコースデヒドロゲナーゼ（GDH）（NA

D (P) GDH : EC 1. 1. 1. 47) や、ピロロキノリンキノン (PQ Q) 依存性のGDH (PQQGDH : EC 1. 1. 5. 2) が、血糖センサ用酵素として用いられている。

[0005] これらは、溶存酸素の影響を受けない点で有利である。しかし、NAD (P) GDHは安定性に乏しく、補酵素の添加が必要であり測定が煩雑であるといった欠点がある。また、PQQGDHは基質特異性に乏しく、マルトースやラクトースといったグルコース以外の糖類にも作用するため、測定値の信頼性に乏しいという欠点がある。

[0006] このような欠点が解消された酵素として、フラビンアデニンジヌクレオチド依存型グルコース脱水素酵素 (FADGDH : EC 1. 1. 99. 10) が注目されている。FADGDHは、フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) を補酵素としてグルコースからD-グルコノ-1, 5-ラクトンへの酸化反応を触媒する酵素であり、*Aspergillus oryzae* や *Aspergillus terreus* といった常温性糸状菌から発見されている。FADGDHは、溶存酸素の影響を受けず、補酵素の添加も必要なく、そして、基質特異性にも優れているという利点を有している。

[0007] *Aspergillus oryzae*、または、*Aspergillus terreus*) 由来のFADGDHについては、例えば、特許文献1 (国際公開第2004/058958号)、特許文献2 (国際公開第2006/101239号)、特許文献3 (特開2008-178380号公報)、特許文献4 (特開2008-154573号公報)、特許文献5 (特開2008-154574号公報)、特許文献6 (特開2010-193913号公報)、特許文献7 (国際公開第2008/001903号公報)、特許文献8 (特開2011-55836号公報)、特許文献9 (特開2011-217755号公報) に開示されている。

[0008] 酵素等を含むグルコースセンサ用試薬の作製工程において、酵素に加熱乾燥処理を施す場合があり、グルコースセンサ用試薬等の保管時の環境温度が高温になる場合も考えられるため、グルコースセンサに用いる酵素は熱安定

性が高いことが望ましい。

[0009] 上述の *Aspergillus* 属糸状菌由来の FADGDH は、野生株から培養・精製して得られたものである場合は、ある程度の熱安定性を有している。しかし、大量生産に最も適している遺伝子組換え大腸菌での発現によって製造された FADGDH は、野生株から培養・精製して得られた FADGDH と比べて、熱安定性が大きく劣ることが分かっている（特許文献 10：国際公開第 2009/119728 号）。なお、このように熱安定性が低下するのは、遺伝子組換え大腸菌によって生産された酵素には、表面に糖鎖が付加されていないためであると考えられている。

[0010] このような遺伝子組換え大腸菌での発現によって製造された FADGDH の熱安定性を向上させるために、例えば、遺伝子レベルでアミノ酸配列を改変する方法が検討されている（特許文献 10）。ここでは、特定の変異を加えた FADGDH の構造遺伝子を用いて大腸菌で組換え FADGDH を発現させた場合に、野生株で産生された FADGDH と同等程度の熱安定性（50℃で 15 分間加熱処理した場合の GDH 活性の安定性）を有する FADGDH が得られることを開示している。しかし、*Aspergillus* 属糸状菌由来の FADGDH を部分的に改変したものであるため、野生株の *Aspergillus* 属糸状菌由来の FADGDH よりも、さらに熱安定性に優れ、より過酷な条件でも失活し難い特性を有する FADGDH を得ることは容易でないと考えられる。

先行技術文献

特許文献

[0011] 特許文献 1：国際公開第 2004/058958 号

特許文献 2：国際公開第 2006/101239 号

特許文献 3：特開 2008-178380 号公報

特許文献 4：特開 2008-154573 号公報

特許文献 5：特開 2008-154574 号公報

特許文献 6：特開 2010-193913 号公報

特許文献7：国際公開第2008／001903号公報

特許文献8：特開2011－55836号公報

特許文献9：特開2011－217755号公報

特許文献10：国際公開第2009／119728号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0012] 本発明は、溶存酸素の影響を受けず、補酵素の添加も必要なく、そして、基質特異性（特にマルトースに対する作用性が低いこと）にも優れているというFADGDHの優れた特性を保ちつつ、従来よりもさらに熱安定性に優れた、グルコース測定用の酵素を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

- [0013] 本発明は、好熱性糸状菌由来のタンパク質であって、フラビンアデニンジヌクレオチド依存型グルコース脱水素酵素活性を有するタンパク質である。

- [0014] また、本発明は、以下の（a）～（d）のいずれかのタンパク質にも関する。

（a） 配列番号1または2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質

（b） 配列番号1または2に記載のアミノ酸配列からシグナルペプチドを除いたアミノ酸配列からなるタンパク質

（c） 上記（a）または（b）のタンパク質のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加または挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質

（d） 上記（a）～（c）のいずれかのタンパク質のアミノ酸配列と70％以上の相同性を有し、かつ、フラビンアデニンジヌクレオチド依存型グルコース脱水素酵素活性を有するタンパク質

なお、このタンパク質も好熱性糸状菌由来であることが好ましい。

- [0015] また、本発明は、配列番号5～7の塩基配列、ならびに、配列番号8および9の塩基配列に相補的な塩基配列からなる群から選択される少なくとも1つの塩基配列でコードされるアミノ酸配列を含み、かつ、フラビンアデニン

ジヌクレオチド依存型グルコース脱水素酵素活性を有するタンパク質にも関する。なお、このタンパク質も好熱性糸状菌由来であることが好ましい。

[0016] 前記好熱性糸状菌は、*Talaromyces emersonii*または*Thermoascus crustaceus*であることが好ましい。また、上記のタンパク質は、糖鎖付加されたタンパク質であることが好ましい。

[0017] また、本発明は、上記のタンパク質をコードする遺伝子にも関する。

また、本発明は、以下の（Ａ）～（Ｄ）のいずれかのDNAからなる遺伝子にも関する。

[0018] （Ａ） 配列番号３または４に記載の塩基配列からなるDNA、

（Ｂ） 配列番号３または４に記載の塩基配列からシグナルペプチドをコードする塩基配列を除いた塩基配列からなるDNA、

（Ｃ） 上記（Ａ）または（Ｂ）のDNAの塩基配列と、イントロンとを含むDNA、

（Ｄ） 上記（Ａ）～（Ｃ）のいずれかのDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつフラビンアデニンジヌクレオチド依存型グルコース脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA。

[0019] また、本発明は、上記の遺伝子を含む組換えベクターにも関する。

また、本発明は、上記の遺伝子を含む形質転換体にも関する。

[0020] また、本発明は、上記の遺伝子を用いたフラビンアデニンジヌクレオチド依存型グルコース脱水素酵素の製造方法にも関する。

[0021] また、本発明は、上記の形質転換体を用いたフラビンアデニンジヌクレオチド依存型グルコース脱水素酵素の製造方法にも関する。

[0022] また、本発明は、上記のタンパク質を含むグルコース濃度測定試薬にも関する。

また、本発明は、上記のタンパク質を用いたグルコースセンサにも関する。

。

[0023] また、本発明は、上記のタンパク質を用いたグルコース濃度測定方法にも関する。

また、本発明は、上記のタンパク質を用いたバイオ燃料電池にも関する。

発明の効果

[0024] 本発明においては、好熱性糸状菌由来のFADGDH活性を有するタンパク質（酵素）を見出したことにより、溶存酸素の影響を受けず、補酵素の添加も必要なく、そして、基質特異性にも優れているというFADGDHの優れた特性を保ちつつ、従来よりもさらに熱安定性に優れた、グルコース測定用の酵素を提供することができる。また、このようなグルコース測定用酵素を用いることにより、グルコース濃度測定試薬やグルコースセンサ作製時や輸送時の酵素の熱失活が低減され、該酵素の使用量低減や測定精度の向上が可能となる。

図面の簡単な説明

[0025] [図1]実施例1での*Ta. emersonii* (NBRC31232)の縮重PCR産物のアガロースゲル電気泳動の結果を示す写真である。

[図2]実施例1での*Th. crustaceus* (NBRC9129)の縮重PCR産物のアガロースゲル電気泳動の結果を示す写真である。

[図3]実施例1での*Th. crustaceus* (NBRC9816)の縮重PCR産物のアガロースゲル電気泳動の結果を示す写真である。

[図4]*Ta. emersonii*由来FADGDH遺伝子全領域を含むDNA断片の塩基配列を示す図である。

[図5]図4に示す塩基配列におけるエキソンの構成を示す模式図である。

[図6]*Ta. emersonii*由来FADGDH遺伝子のORFの塩基配列と、その塩基配列から類推されるアミノ酸配列を示す図である。

[図7]好熱性糸状菌(*Ta. emersonii*、*Th. crustaceus*)由来FADGDHのアミノ酸配列と、*Aspergillus*属糸状菌由来FADGDHのアミノ酸配列の相同性を示す図である。

[図8]*Th. crustaceus*由来FADGDH遺伝子全領域を含むDN

A断片の塩基配列を示す図である。

[図9]図8に示す塩基配列におけるエキソンの構成を示す模式図である。

[図10] *Th. crustaceus* 由来FADGDH遺伝子のORFの塩基配列と、その塩基配列から類推されるアミノ酸配列を示す図である。

[図11]実施例4のSDS-PAGEの結果を示す図である。

[図12]実施例5の *Ta. emersonii* 由来FADGDHについての吸収スペクトルを示す図である。

[図13]実施例5の *Th. crustaceus* 由来FADGDHについての吸収スペクトルを示す図である。

[図14]実施例8のSDS-PAGEの結果を示す図である。

[図15]実施例9の *Ta. emersonii* 由来FADGDHについての吸収スペクトルを示す図である。

[図16]実施例9の *Th. crustaceus* 由来FADGDHについての吸収スペクトルを示す図である。

[図17]実施例10のpH安定性評価における *Ta. emersonii* 由来FADGDHの残活性率を示すグラフである。

[図18]実施例10のpH安定性評価における *Th. crustaceus* 由来FADGDHの残活性率を示すグラフである。

[図19]実施例10のpH依存性評価における *Ta. emersonii* 由来FADGDHの相対活性を示すグラフである。

[図20]実施例10のpH依存性評価における *Th. crustaceus* 由来FADGDHの相対活性を示すグラフである。

[図21]実施例10の温度安定性評価における *Ta. emersonii* 由来FADGDHの残活性率を示すグラフである。

[図22]実施例10の温度安定性評価における *Th. crustaceus* 由来FADGDHの残活性率を示すグラフである。

[図23]実施例10の温度依存性評価における *Ta. emersonii* 由来FADGDHの相対活性を示すグラフである。

[図24]実施例10の温度依存性評価における *Th. crustaceus* 由来 FADGDH の相対活性を示すグラフである。

[図25]実施例10のグルコースセンサーチップでの応答性評価における *Ta. emersonii* 由来 FADGDH (glycosylated) についての電流値を示すグラフである。

[図26]実施例10のグルコースセンサーチップでの応答性評価における *Ta. emersonii* 由来 FADGDH (non glycosylated) についての電流値を示すグラフである。

[図27]実施例10のグルコースセンサーチップでの応答性評価における *Th. crustaceus* 由来 FADGDH (glycosylated) についての電流値を示すグラフである。

[図28]実施例10のグルコースセンサーチップでの応答性評価における *Th. crustaceus* 由来 FADGDH (non glycosylated) についての電流値を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0026] (実施形態1)

本実施形態の発明は、好熱性糸状菌由来のタンパク質であって、FADGDH 活性を有するタンパク質（酵素）である。

[0027] これまで、好熱性糸状菌由来のFADGDH活性を有するタンパク質は知られておらず、FADGDHの熱安定性を向上する方策としての、好熱性糸状菌由来のFADGDH活性を有するタンパク質の探索も行われていなかった。また、好熱性糸状菌の産生するタンパク質を分析することにより、FADGDH活性を有するタンパク質を探索するのは、FADGDHの産生量がごく微量であるため、現実的には困難である。

[0028] 本発明者らは、好熱性糸状菌のゲノムDNAを独自の手法で調べることで、いくつかの好熱性糸状菌がFADGDH活性を有するタンパク質を産生していることを見出した。すなわち、FADGDHを産生することが知られている常温性糸状菌（*Aspergillus* 属糸状菌）に由来するFA

DGDHの一次構造（アミノ酸配列）の共通部分に着目し、該共通部分のうちの特定のアミノ酸配列をコードする塩基配列に相当するプライマーを用いて、好熱性糸状菌ゲノムDNAを鋳型とする縮重PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）を行ない、そのPCR産物を分析することにより、好熱性糸状菌がFADGDH活性を有するタンパク質を産生しているかどうかを判別することができた。

[0029] 常温性糸状菌由来FADGDHのアミノ酸配列の共通部分のうちの特定のアミノ酸配列は、好ましくは、YDYIVVGGGTSGL、QVLRAGKALGGTSTINGMAYTRAEDVQID、RSNFHPVGTAAMM、または、NVRVVDASVLPFQVCGHLVSTLYAVAEERAである。

[0030] 縮重PCR用のプライマーは、これらのアミノ酸配列の少なくとも一部をコードする塩基配列またはこれと相補的な塩基配列を含むプライマーを用いることが好ましい。

[0031] このような好ましいプライマーのうち、センスプライマーの塩基配列としては、

(A) 5' - TAYGAYTAYATCGTTTYTKGGAGGCGG
- 3'（配列番号5）、

(B) 5' - CAAGTKCTNCGTGCRGGRAAGGCCCT
TGG - 3'（配列番号6）、

(C) 5' - ACSCGCGCMGAGGATGTCCAGAT - 3'
（配列番号7）

が挙げられる。

[0032] アンチセンスプライマーの塩基配列としては、

(D) 5' - CATCATGGCAGCMGTTKCCGACGGGRT
GGAAGTT - 3'（配列番号8）、

(E) 5' - GTGCTMACCAARTGGCCGCARACCTG
GAA - 3'（配列番号9）

が挙げられる。

[0033] したがって、本実施形態の具体的なタンパク質としては、配列番号5～7の塩基配列、ならびに、配列番号8および9の塩基配列に相補的な塩基配列からなる群から選択される少なくとも1つの塩基配列でコードされるアミノ酸配列を含み、かつ、フラビンアデニンジヌクレオチド依存型グルコース脱水素酵素活性を有するタンパク質が挙げられる。

[0034] 好熱性糸状菌は、FADGDH活性を有し、熱安定性に優れたタンパク質を産生するものであれば特に限定されないが、至適生育温度が35°C以上であるか、あるいは、生育限界温度が50°C以上であることが好ましい。より好ましい好熱性糸状菌は、*Talaromyces emersonii* (Ta. emersonii) または *Thermoascus crustaceus* (Th. crustaceus) である。

[0035] 本発明のタンパク質（酵素）は、糖鎖が付加されたものであることが好ましい。一般に糖鎖が付加されたタンパク質は糖鎖が付加されたタンパク質よりも熱安定性等に優れる場合が多いからである。ただし、本発明のFADGDH活性を有する組換えタンパク質は、意外にも、表面に糖鎖が付加されている場合（例えば、組換え酵母や好熱性糸状菌の野生株が産生したFADGDH）だけでなく、表面に糖鎖が付加されていない場合（例えば、組換え大腸菌によりFADGDHを製造した場合）でも、従来と比べれば比較的優れた熱安定性を有する傾向を有している。このため、実用的に問題のない熱安定性を有するものが得られる限り、組換え大腸菌により糖鎖が付加されていない組換えFADGDHを製造してもよく、この場合、製造効率の面では非常に有利であり、大幅な製造コストの削減が可能である。なお、熱安定性は、所定の温度および時間の熱処理後に、酵素のFADGDH活性を測定し、その熱処理前のFADGDH活性値に対する比率を求めることにより判断される。FADGDH活性は、種々公知の方法で測定することができる。

[0036] （実施形態2）

本実施形態の発明は、以下の（a）～（d）のいずれかのタンパク質であ

る。

- (a) 配列番号 1 または 2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、
- (b) 配列番号 1 または 2 に記載のアミノ酸配列からシグナルペプチドを除いたアミノ酸配列からなるタンパク質、
- (c) 上記 (a) または (b) のタンパク質のアミノ酸配列において、1 もしくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加または挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質、
- (d) 上記 (a) ~ (c) のいずれかのタンパク質のアミノ酸配列と 70 %以上の相同性を有し、かつ、フラビンアデニンジヌクレオチド依存型グルコース脱水素酵素活性を有するタンパク質。

[0037] 配列番号 1 は、「野生型の *Talaromyces emersonii* 由来の FADGDH のアミノ酸配列」であって、シグナルペプチドも含んでいる。配列番号 2 は、「野生型の *Thermoascus crustaceus* 由来の FADGDH のアミノ酸配列」であって、シグナルペプチドも含んでいる。*Talaromyces emersonii* および *Thermoascus crustaceus* はいずれも好熱性糸状菌である。

[0038] シグナルペプチドは、糸状菌等によるタンパク質分子の生合成の過程において、細胞内で生合成されたタンパク質を、適切な場所に輸送するために不可欠な構造である。シグナルペプチド部分は、例えば配列番号 1 のような「シグナルペプチドを含むアミノ酸配列」をコードする遺伝子の情報に基づいて、いったんは合成されるが、最終的にはその役割を終えたのち切除される。

[0039] なお、本実施形態のタンパク質も、好熱性糸状菌由来のタンパク質であることが好ましい。

[0040] (実施形態 3)

本実施形態の発明は、上記実施形態 1 または 2 のタンパク質をコードする遺伝子である。具体的には、以下の (A) ~ (D) のいずれかの DNA からなる遺伝子が挙げられる。

- (A) 配列番号3または4に記載の塩基配列からなるDNA、
- (B) 配列番号3または4に記載の塩基配列からシグナルペプチドをコードする塩基配列を除いた塩基配列からなるDNA、
- (C) 上記(A)または(B)のDNAの塩基配列と、イントロンとを含むDNA、
- (D) 上記(A)～(C)のいずれかのDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつフラビンアデニンジヌクレオチド依存型グルコース脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA。

[0041] 配列番号3は、「野生型の*Talaromyces emersonii*由来のFADGDHをコードする遺伝子の塩基配列」であって、シグナルペプチドをコードする塩基配列および終止コドンも含んでいる。配列番号4は、「野生型の*Thermoascus crustaceus*由来のFADGDHをコードする遺伝子の塩基配列」であって、シグナルペプチドをコードする塩基配列および終止コドンも含んでいる。

[0042] 「上記(A)または(B)のDNAの塩基配列と、イントロンとを含むDNA」とは、上記(A)または(B)のDNAの塩基配列をエキソンとし、そのエキソン配列の途中にイントロン配列が介在しているDNAである。

[0043] また、本実施形態の遺伝子には、上記(A)または(B)のDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつGDH活性を有するタンパク質をコードするDNAからなる遺伝子も含まれる。

[0044] ここで、ストリンジェントな条件とは、用いられるプローブ・標識方法によっても異なるが、例えば、ハイブリダイズの条件としては、「0.02% SDSを含む5×SSC中で40～70℃」の条件が挙げられる。なお、ストリンジェントな条件は、結合する核酸の融解温度(T_m)に基づいて決定することができる。ハイブリダイズ後の洗浄条件としては、例えば、「2×SSC、0.1% SDS、室温(25℃)」の条件が挙げられる。ストリン

ジェントな条件では、配列番号 3 または 4 に示す塩基配列と 90%以上の相同性、好ましくは 95%以上の相同性、より好ましくは 97%以上の相同性が配列間に存在するときのみハイブリダイゼーションが起こることが好ましい。

[0045] 本実施形態の遺伝子の塩基配列は、これらの具体例に限定されず、実施形態 1 または 2 のタンパク質をコードするものであればよく、FADGDH の発現を向上させるように、コドン出現頻度 (Codon usage) を変えた塩基配列なども含まれる。

[0046] (実施形態 4)

本実施形態の発明は、実施形態 3 の遺伝子を含む組換えベクターである。実施形態 3 の遺伝子は、例えば、プラスミドベクターと連結された状態にて宿主微生物に導入され、該宿主は FADGDH を生産する形質転換体となる。

[0047] (実施形態 5)

本実施形態の発明は、実施形態 3 の遺伝子を含む形質転換体である。形質転換体の宿主としては、大腸菌、酵母、糸状菌、動物細胞、昆虫細胞など目的に応じて様々な宿主を用いることができるが、好ましくは大腸菌、酵母、糸状菌等の微生物由来の真核生物である。生産効率の点からは大腸菌を用いることが好ましい。大腸菌としては、例えば、大腸菌 JM109、大腸菌 DH5 α 、大腸菌 W3110、大腸菌 C600 などが使用できる。また、糖鎖が付加されたタンパク質を生産するためには、宿主として真核生物を用いることが好ましい。真核生物の中でも酵母は産業上多くの利用実績があり、例えば、*Pichia pastoris* (P. pastoris)、*Saccharomyces cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe* が使用できる。

[0048] 本実施形態の具体例としては、例えば、実施形態 4 の組換えベクターで形質転換された大腸菌または酵母が挙げられる。

[0049] (実施形態 6)

本実施形態の発明は、実施形態 3 の遺伝子を用いた好熱性糸状菌由来の F A D G D H の製造方法である。本実施形態では、例えば、実施形態 5 の形質転換体を用いることにより、F A D G D H を製造することができる。具体的には、例えば、以下に示すような手順で製造することが可能である。

[0050] 好熱性糸状菌由来の F A D G D H の遺伝情報を有する D N A （実施形態 3 の遺伝子）は、プラスミドベクターと連結された状態にて宿主に導入される。宿主については、上記実施形態 5 で説明した宿主と同様である。なお、大腸菌で F A D G D H 活性を有するタンパク質を生産する場合、上記遺伝子の N 末端にあるシグナルペプチドを残したままでは十分な生産能が得られないことがあるため、シグナルペプチド（ゲノム情報からシグナルペプチドと推定されるアミノ酸配列）を削除した上記遺伝子は大腸菌に導入することが好ましい。

[0051] 宿主に組換えベクターを導入する方法としては、例えば宿主が大腸菌に属する微生物の場合には、カルシウムイオンの存在下で組換え D N A の導入を行う方法などを採用することができる。また、エレクトロポレーション法を用いても良い。さらに、市販のコンピテントセル（例えばコンピテントハイ J M 1 0 9 ；東洋紡績）を用いても良い。宿主が酵母の場合には、スフェロプラスト法や酢酸リチウム法などが用いられる。また、エレクトロポレーション法などを用いても良い。宿主が糸状菌の場合には、プロトプラスト化された細胞等が用いられる。

[0052] こうして得られた形質転換体である微生物は、栄養培地で培養されることにより、多量の F A D G D H を安定して生産し得る。形質転換体である宿主微生物の培養形態は宿主の栄養生理的性質を考慮して培養条件を選択すればよく、通常多くの場合は液体培養で行うが、工業的には通気攪拌培養を行うのが有利である。

[0053] 培地の栄養源としては微生物の培養に通常用いられるものが広く使用される。炭素源としては資化可能な炭素化合物であればよく、例えば、グルコース、シュークロース、ラクトース、マルトース、糖蜜、ピルビン酸などが使

用される。窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、例えばペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕アルカリ分解物などが使用される。その他、リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガン、亜鉛などの塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミンなどが必要に応じて使用される。

[0054] 培地温度は菌が発育し、FADGDHを生産する範囲で適宜変更し得るが、大腸菌の場合、好ましくは20～42℃程度であり、酵母の場合、好ましくは20～35℃程度である。培養時間は培養条件によって異なるが、FADGDHが最高収量に達する時期を見計らって適当な時期に培養を終了すればよく、通常は6～72時間程度である。培地pHは菌が発育しFADGDHを生産する範囲で適宜変更しうるが、特に好ましくはpH5.0～9.0程度である。

[0055] 培養物中のFADGDHを生産する菌体を含む培養液をそのまま採取し利用することもできるが、一般にはFADGDHが培養液中に存在する場合は、濾過、遠心分離などにより、タンパク質の含有溶液と微生物菌体とを分離した後に利用される。一方、FADGDHが菌体内に存在する場合は、得られた培養物から濾過または遠心分離などの手法により菌体を採取し、次いでこの菌体を機械的方法またはリゾチームなどの酵素的で破壊し、また必要に応じてEDTA等のキレート剤及びまたは界面活性剤を添加してFADGDHを可溶化し、水溶液として分離採取する。

[0056] このようにして得られたFADGDH含有溶液からFADGDHを回収する方法としては、例えば、減圧濃縮、膜濃縮、硫酸アンモニウムや硫酸ナトリウムなどを用いた塩析処理、または、親水性有機溶媒（例えばメタノール、エタノール、アセトン）による分別沈殿法が挙げられる。また、加温処理や等電点処理も有効な精製手段である。また、吸着剤或やゲル濾過剤などを用いたゲル濾過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーにより、FADGDHを精製することもできる。

[0057] 好熱性糸状菌由来のFADGDHの製造はこのような方法に限定されず、例えば、実施形態3の遺伝子を用いて無細胞タンパク質翻訳系によって好熱性糸状菌由来のFADGDHを製造することも可能である。

[0058] (実施形態7)

本実施形態の発明は、実施形態1または2のタンパク質を含むグルコース濃度測定試薬を用いたグルコースセンサである。

[0059] グルコース濃度測定試薬は、実施形態6の方法により製造されたFADGDHを少なくとも1回の測定に十分な量で含む。また、グルコース濃度測定試薬は、該FADGDH以外に、例えば、アッセイに必要な緩衝液、メディエーター、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を含み得る。グルコース濃度測定試薬の形態は特に限定されないが、グルコースセンサ用に適した種々の形態（例えば、凍結乾燥された試薬や、適切な保存容器中の溶液）で提供され得る。

[0060] グルコースセンサに用いられる電極は、特に限定されないが、カーボン電極、金電極、白金電極などを用いることができる。例えば、この電極上には、本発明のタンパク質（酵素：FADGDH）が固定化される。

[0061] 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、あるいはフェロセンあるいはその誘導体に代表される電子メディエーターとともに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、本発明のタンパク質（FADGDH）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架橋する方法が用いられる。

[0062] (実施形態8)

本実施形態の発明は、実施形態1または2のタンパク質を用いたグルコース濃度測定方法である。グルコース濃度の測定は、例えば、以下のように行うことができる。

[0063] 恒温セルに緩衝液を入れ、一定温度に維持する。メディエーターとしては、フェリシアン化カリウム、フェナジンメトサルフェートなどを用いることができる。作用電極として本発明の改変型FADGDH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）を用いる。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。

[0064] （実施形態9）

本実施形態の発明は、実施形態1または2のタンパク質（FADGDH）を用いたバイオ燃料電池である。FADGDHは、グルコースの脱水素反応を触媒し、この反応により生じた電子が電力として供給される。

実施例

[0065] 以下、実施例を挙げて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0066] （実施例1）

独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部生物資源部門（NBRC）より購入した表1に示す好熱性糸状菌17種を対象として、好熱性糸状菌からのFADGDH遺伝子のスクリーニングを行った。

[0067]

[表1]

好熱性糸状菌	NBRC 番号
<i>Chaetomium thermophilum</i> var. <i>coprophilum</i>	9679
<i>Chaetomium thermophilum</i> var. <i>coprophilum</i>	30072
<i>Chaetomium thermophilum</i> var. <i>dissitum</i>	31807
<i>Malbranchea cinnamomea</i>	8834
<i>Malbranchea cinnamomea</i>	9739
<i>Melanocarpus albomyces</i>	9683
<i>Melanocarpus albomyces</i>	30079
<i>Myceliophthora hinnulea</i>	31379
<i>Myceliophthora thermophila</i>	9219
<i>Myceliophthora thermophila</i>	9746
<i>Paecilomyces variotii</i>	7563
<i>Paecilomyces variotii</i>	33284
<i>Rhizomucor miehei</i>	9740
<i>Rhizomucor miehei</i>	9741
<i>Rhizomucor pusillus</i>	4578
<i>Rhizomucor pusillus</i>	4579
<i>Talaromyces byssochlamydoides</i>	31900
<i>Talaromyces byssochlamydoides</i>	32236
<i>Talaromyces emersonii</i>	31232
<i>Talaromyces emersonii</i>	9734
<i>Talaromyces thermophilus</i>	30541
<i>Talaromyces thermophilus</i>	31798
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	6766
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	9748
<i>Thermoascus crustaceus</i>	9129
<i>Thermoascus crustaceus</i>	9816
<i>Thermoascus thermophilus</i>	9643
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	9738
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	9863
<i>Thielavia minuta</i>	31063
<i>Thielavia terrestris</i>	9121
<i>Thielavia terrestris</i>	9732

[0068] 購入した好熱性糸状菌は、ポテトデキストロース培地（Difco Laboratories）または麦芽エキス培地（2%麦芽エキス、2%グルコース、0.1%ペプトン）を用いて好氣的に培養した。培養後の好熱性糸状菌から Wizard Genomic DNA Purification

n Kit (Promega) を用いてゲノムDNAを抽出した。

[0069] 既報のアスペルギルス属糸状菌 (*Aspergillus oryzae*、*Aspergillus terreus*) に由来するFADGDHの一次構造 (アミノ酸配列) の共通部分に着目して、本発明者らが独自に設計した後述のプライマーを用いて、好熱性糸状菌ゲノムDNAを鋳型とする縮重PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) を行なった。

[0070] 縮重PCR用のセンスプライマーとしては、

プライマーA (5' -TAYGAYTAYATCGTTTYTYGGAGGCCGG-3')、

プライマーB (5' -CAAGTKCTNCGTGCRGGRAAGGCCCTTGG-3')、

プライマーC (5' -ACSCGCGCMGAGGATGTCCAGAT-3')

のいずれかを用いた。

[0071] アンチセンスプライマーとしては、

プライマーD (5' -CATCATGGCAGCMGTKCCGACGGGRTGGAAGTT-3')、

プライマーE (5' -GTGCTMACCAARTGGCCGCGARACCTGGA-3') のいずれかを用いた。

[0072] なお、上記プライマーA～Eは配列中にミックス塩基 (K、N、M、R、S、Y) を含んでいるが、プライマーA～Eの各々は、ミックス塩基の箇所において塩基配列が異なる複数種のプライマーの混合物を意味する。

[0073] 上記17種の好熱性糸状菌から得たゲノムDNAを鋳型として、上記3種のセンスプライマーと2種のアンチセンスプライマーとの組み合わせによる6通りの縮重PCRを行った。得られたPCR産物をアガロースゲル電気泳動 (1.2%アガロースゲル) に供し、泳動後のゲルについて臭化エチジウム染色を施すことによりPCR産物の存在を確認した。

[0074] その結果、*Ta. emersonii* (NBRC31232)、*Th. c*

r u s t a c e u s (NBRC9129)、および、*T h . c r u s t a c e u s* (NBRC9816)の3種の好熱性糸状菌のゲノムを鋳型として得られたPCR産物について、約1.8kbのDNAバンドが検出された(図1～図3中の*印)。なお、図1～3において、レーンMはマーカーであり、レーン1はプライマーAとDの組合せを用いた場合、レーン2はプライマーAとEの組合せを用いた場合、レーン3はプライマーBとDの組合せを用いた場合、レーン4はプライマーBとEの組合せを用いた場合、レーン5はプライマーCとDの組合せを用いた場合、レーン6はプライマーCとEの組合せを用いた場合を示している。

[0075] 縮重PCRで増幅されたDNA断片を、pCR-Blunt-II-TOPO (Life Technologies) に連結した後に、大腸菌DH5 α (宝酒造) にサブクローニングした。挿入DNA断片の塩基配列解析を行った結果、既報のアスペルギルス属糸状菌由来FADGDH遺伝子と高い相同性を有する遺伝子断片の増幅が確認された。このことから、*T a . e m e r s o n i i*と*T h . c r u s t a c e u s*のゲノムにFADGDH遺伝子が存在することが示唆された。なお、*T h . c r u s t a c e u s*のNBRC9129とNBRC9816は、同一のFADGDH遺伝子の塩基配列を含んでいた。

[0076] なお、上記プライマーA～E以外のいくつかのプライマーを用いてスクリーニングを行った場合は、アスペルギルス属糸状菌由来FADGDH遺伝子と高い相同性を有する遺伝子断片の増幅は確認できなかった。

[0077] (実施例2)

本実施例では、*T a . e m e r s o n i i*由来FADGDHを大腸菌を用いて製造した。以下、詳細について説明する。

[0078] (1) *T a . e m e r s o n i i* (NBRC31232) からのFADGDH遺伝子のクローニング

クローニングに先立ち、*T a . e m e r s o n i i*由来FADGDH遺伝子部分断片をプローブとするゲノムDNAのサザンハイブリダイゼーション

解析を行なった。Ta. emersoniiゲノムDNAを各種制限酵素（New England BioLabs）で切断し、アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後、ゲルに含まれているDNA断片を20 X SSC（3M NaCl、0.3M クエン酸三ナトリウム、pH7.0）を用いたキャピラリー法によりナイロンメンブレン（Hybond-N+；GE Healthcare）に転写した。転写後のナイロンメンブレンとジギキゲンニ標識プローブDNA（DIG DNA Labeling and Detection Kit；Roche）を混合し、65℃でハイブリダーゼーションを行なった。プローブとハイブリダイズしたDNA断片はアルカリホスファターゼ標識抗DIG抗体（DIG DNA Labeling and detection Kit）を用いて検出した。

[0079] その結果、EcoRIのレーンから約4.0 kbの位置にプローブとハイブリダイズするDNAバンドが検出された。既報のアスペルギルス属糸状菌由来FADGDH遺伝子のオープンリーディングフレーム（ORF）が約1.8 kbであることから、プローブとハイブリダイズするこの約4.0 kbのEcoRI断片が、Ta. emersonii由来FADGDH遺伝子の全領域を包括しているものと考えられた。

[0080] 次に、Inverse PCRにより、Ta. emersonii由来FADGDH遺伝子の開始コドン近傍領域を含む5' -flanking領域と、終始コドン近傍領域を含む3' -flanking領域のクローニングを試みた。EcoRIで切断したTa. emersoniiのゲノムDNAを調製用アガロースゲルに供し、約4.0 kbのDNA断片を回収した。このDNA断片をT4リガーゼ（宝酒造）により環状化し、Inverse PCRの鋳型とした。

[0081] Ta. emersonii由来FADGDH遺伝子内部配列に基づいて設計したプライマー31232GSP3（5' -GTTGTTGGGCTGCATCTCGATGAAGCC-3'）、および、プライマー31232GSP5（5' -CCATCTGTGACGGACCTCTTTGGCAAC

C G C - 3') を用いて *Inverse PCR* を行なった結果、約 3.0 kb の位置に単一の DNA 断片が検出された。

[0082] この DNA 断片をサブクロニングし塩基配列解析を行なったところ、*Ta. emersonii* 由来 *FADGDH* 遺伝子の 5' - *flanking* 領域と 3' - *flanking* 領域の増幅に成功したことがわかった。

[0083] 次に、5' - *flanking* 領域および 3' - *flanking* 領域の配列に基づいて設計したプライマー 31232GSP9 (5' - G C A T G C C G A G G A C T A C T T G T A T T C C G G G A T - 3') と 31232GSP10 (5' - G A T A T C T G C A T T T C G G G C A T T C C T A T C T C T - 3') を用いて *Ta. emersonii* 由来ゲノム DNA を鋳型とする PCR を行なった。その結果、単一の約 2.8 kb の DNA 断片の増幅が確認され、この DNA 断片が *Ta. emersonii* 由来 *FADGDH* 遺伝子全領域を含んでいることがわかった。

[0084] (2) *Ta. emersonii* 由来 *FADGDH* 遺伝子の塩基配列解析
Ta. emersonii 由来 *FADGDH* 遺伝子全領域を含む DNA 断片の塩基配列はプライマーウォーキング法により決定した。*Ta. emersonii* 由来 *FADGDH* 遺伝子全領域を含む DNA 断片の塩基配列を図 4 に示す。

[0085] スプライシング部位を G T - A G 則に基づいて予測することにより、この塩基配列中のエキソンとイントロンを特定した。*Ta. emersonii* 由来 *FADGDH* 遺伝子は、4つのエキソン (エキソン 1 ; 346 bp、エキソン 2 ; 598 bp、エキソン 3 ; 614 bp、エキソン 4 ; 221 bp) から構成される 1779 bp の ORF (593 アミノ酸をコード) を含んでいた (図 4 の下線部および図 5 参照)。

[0086] 図 6 に、このようにして特定された *Ta. emersonii* 由来 *FADGDH* 遺伝子の ORF (*FADGDH* コーディング領域) の塩基配列と、その塩基配列から類推されるアミノ酸配列を示す。

[0087] 図 6 に示すアミノ酸配列について、シグナルペプチドの存在の有無および

シグナルペプチド切断部位を、シグナルペプチド予測サーバーSignalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)により推測した。その結果、開始コドンに由来するメチオニン (Met 1) から17番目のアラニン (Ala 17) までの配列がシグナルペプチドとして同定された。また、図6に示すアミノ酸配列において、FAD結合に重要なFAD結合モチーフ (Gly-Gly-Gly-Thr-Ser-Gly) は完全に保存されていた。

[0088] さらに、*Ta. emersonii*由来FADGDHのアミノ酸配列 (図6) を、*Aspergillus*属糸状菌由来FADGDHと比較したところ、*Aspergillus oryzae*由来FADGDHと42%の相同性を有し、*Aspergillus terreus*由来FADGDHと40%の相同性を有していた (図7)。

[0089] (3) *Ta. emersonii*由来FADGDH遺伝子発現型プラスミドの作製

*Ta. emersonii*由来FADGDH遺伝子のコーディング領域をOverlap extension PCRにより合成した。

[0090] まず、各エキソンをPCR増幅した。エキソン1のPCR増幅には、プライマーとして、31232GSP11 (5' -ACCATGCTGCGCCGGACCGTTGGCATCCTC-3') と31232E1A (5' -GGCCATTCCATTGATCGTGCTCGTGCCCTCC-3') を用いた。エキソン2のPCR増幅には、プライマーとして、31232E2S (5' -ATCAATGGAATGGCCTATACGCGCGCCCCAA-3') と31232E2A (5' -CAGAATGCTTGGATTCCCAACCCAGAGAG-3') を用いた。エキソン3のPCR増幅には、プライマーとして、31232E3S (5' -AATCCAAGCA TTCTGAACAAATACAACATT-3') と31232E3A (5' -CGACCGATATGTCTCCTTCAGCCACGCCTC-3') を用いた。エキソン4のPCR増幅には、プライマーとして、31232

E4S (5' -GAGACATATCGGTCGAATTTCCATCCCGTC-3') と 31232GSP12 (5' -GCGTCAATTGCCCAATCTGGCCGCATCCTC-3') を用いた。

[0091] 増幅したエキソン1とエキソン2をOverlap-extension PCRにより連結し、また同時にエキソン3とエキソン4もOverlap-extension PCRにより連結した。Overlap-extension PCRにより合成した両DNA断片を再度Overlap-extension PCRにより連結し、Ta. emersonii由来FADGDH遺伝子のコーディング領域を合成した。

[0092] 次に、Ta. emersonii由来FADGDH遺伝子コーディング領域を鋳型として、発現型プラスミド作製用プライマー31232Esc2 (5' -AAACATATGGCTCCGCTGTGCCAGACTGCC-3') および31232Esc4 (5' -TTTAAGCTTTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGATTGCCCAATCTGGCCGCATC-3') を用いたPCRを行ない、成熟型FADGDHをコードする遺伝子を増幅した。なお、増幅したTa. emersonii成熟型FADGDHをコードする遺伝子のC末端側にはヒスチジンタグを融合するためのヒスチジンのコドン(CAC)が付加されている。

[0093] 増幅したDNA断片をNdeIおよびHindIIIで切断した後に、大腸菌用発現ベクターpET-21b(+) (Novagen)の同一制限酵素サイトに連結することにより、Ta. emersonii由来FADGDH遺伝子発現型プラスミドを作製した。

[0094] (4) Ta. emersonii由来FADGDH遺伝子の大腸菌における発現と組換え酵素の精製

Ta. emersonii由来FADGDH遺伝子発現型プラスミドを大腸菌BLR(DE3)株(Novagen)に導入した。発現型プラスミドを保有するBLR(DE3)をLB培地(100μg/mLアンピシリン含有)で一晩培養した(前培養)。本培養用LB培地(100μg/mLアン

ピシリン含有)に前培養液を1%植菌し、4時間ほど37℃で好氣的に培養した。その後、イソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を終濃度0.1%となるように添加し、25℃で約20時間培養を続けた。

[0095] 培養後の大腸菌を集菌し、PBS緩衝液(140mM NaCl、2.7mM KCl、8.1mM リン酸水素二ナトリウム12水和物、1.5mM リン酸二水素カリウム、pH7.4)に懸濁することにより菌体を洗浄した。遠心分離により、再度集菌した菌体をPBS緩衝液に懸濁した。PBS緩衝液に懸濁した菌体は超音波により破碎した。超音波破碎後の破碎液を遠心分離(8000g、10分間、4℃)することにより上清(全菌体画分)と沈殿(未破碎菌体)に分離した。全菌体画分をさらに遠心分離(12000g、20分間、4℃)し、可溶性画分と不溶性画分とに分画した。可溶性画分をPBS緩衝液で平衡化したNi-NTA Agarose (QIAGEN)カラム(直径0.7cm、高さ1.0cm)に供した。カラムをPBS緩衝液で洗浄した後に、吸着したタンパク質を100mMイミダゾールを含む20mM HEPES-NaOH緩衝液(pH7.5)で溶出した。

[0096] 溶出画分を20mM HEPES-NaOH緩衝液(pH7.5)で平衡化したQ Sepharose Fast Flow (GE Healthcare)カラム(直径0.7cm、高さ2.5cm)に供した。カラムを20mM HEPES-NaOH(pH7.5)で洗浄した後に、吸着したタンパク質を100mM NaClを含む20mM HEPES-NaOH緩衝液(pH7.5)で溶出した。溶出画分をAmicon Ultra-15 MWCO10 (Millipore)を用いて脱塩処理を施し、20mM HEPES-NaOH緩衝液(pH7.5)で平衡化したResource Q 1mL (GE Healthcare)に供した。吸着したタンパク質を0~1.0M NaCl 直線濃度勾配(20カラム体積)により溶出した。溶出画分をAmicon Ultra-4 MWCO10 (Millipore)を用いて脱塩処理を施し、Ta. emersonii由

来FADGDH精製標品とした。

[0097] なお、シグナルペプチドをコードする遺伝子を付加した*Ta. emersonii*由来FADGDH遺伝子発現型プラスミドを作製し大腸菌における発現を試みたが、発現は確認されなかった。

[0098] (実施例3)

本実施例では、*Th. crustaceus* (NBRC9129) 由来FADGDHを大腸菌を用いて製造した。以下、詳細について説明する。

[0099] (1) *Th. crustaceus* (NBRC9129) からのFADGDH遺伝子のクローニング

クローニングに先立ち、*Th. crustaceus*由来FADGDH遺伝子部分断片をプローブとするゲノムDNAのサザンハイブリダイゼーション解析を行なった。*Th. crustaceus*ゲノムDNAを各種制限酵素で切断し、アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後、ゲルに含まれているDNA断片を20×SSCを用いたキャピラリー法によりナイロンメンブレンに転写した。転写後のナイロンメンブレンとジゴキシゲニン標識したプローブDNAを混合し、65℃でハイブリダーゼーションを行なった。プローブとハイブリダイズしたDNA断片はアルカリホスファターゼ標識抗DIG抗体を用いて検出した。

[0100] その結果、*HindIII*のレーンの約5.0kbの位置にプローブとハイブリダイズするDNAバンドが検出された。既報のアスペルギルス属糸状菌由来FADGDH遺伝子のORFが約1.8kbであることから、プローブとハイブリダイズするこの約5.0kbの*HindIII*が*Th. crustaceus*由来FADGDH遺伝子全領域を包括しているものと考えられた。

[0101] 次に、Inverse PCRにより、*Th. crustaceus*由来FADGDH遺伝子の開始コドン近傍領域を含む5'-flanking領域と終始コドン近傍領域を含む3'-flanking領域のクローニングを試みた。

[0102] HindIIIで切断した*Th. crustaceus*ゲノムDNAを調製用アガロースゲルに供し、約5.0 kbのDNA断片を回収した。このDNA断片をT4リガーゼにより環状化し、Inverse PCRの鋳型とした。*Th. crustaceus*由来FADGDH遺伝子内部配列に基づいて設計したプライマー9129GSP3 (5' -GCTGCCGTTCATCATCTCGTAGGTCCAGCC-3')、および、9129GSP5 (5' -GGCAGCAACGTGACAAACGTGGCCAAG-3')を用いてInverse PCRを行ない、約3.5 kbの位置に単一のDNA断片が検出された。このDNA断片をサブクローニングし塩基配列解析を行なったところ、*Th. crustaceus*由来FADGDH遺伝子の5' -flanking領域と3' -flanking領域の増幅に成功した。

[0103] 次に、5' -および3' -flanking領域の配列に基づいて設計したプライマー91229GSP9 (5' -CTCGAGCAATTTAATTATGCTTCGACGGT-3')と9129GSP10 (5' -AGATCTCCATTCCCGCTGGACCTGGACGGT-3')を用いて*Th. crustaceus*ゲノムDNAを鋳型とするPCRを行なった。

[0104] その結果、電気泳動的に単一の約2.6 kbのDNA断片の増幅が確認され、このDNA断片が*Th. crustaceus* FADGDH遺伝子全領域を含んでいることがわかった。

[0105] (2) *Th. crustaceus*由来FADGDH遺伝子の塩基配列解析

*Th. crustaceus*由来FADGDH遺伝子全領域を含むDNA断片の塩基配列はプライマーウォーキング法により決定した。*Th. crustaceus*由来FADGDH遺伝子全領域を含むDNA断片の塩基配列を図8に示す。

[0106] スプライシング部位をGT-AG則に基づいて予測することにより、この

塩基配列中のエキソンとイントロンを特定した。Th. crustaceus由来FADGDH遺伝子は4つのエキソン（エキソン1； 319 bp、エキソン2； 604 bp、エキソン3； 620 bp、エキソン4； 209 bp）から構成される1752 bpのORF（594アミノ酸をコード）を含んでいた（図8の下線部および図9参照）。

[0107] 図10に、このようにして特定されたTh. crustaceus由来FADGDH遺伝子のORF（FADGDHコーディング領域）の塩基配列と、その塩基配列から類推されるアミノ酸配列を示す。

[0108] 図10に示すアミノ酸配列について、シグナルペプチドの存在の有無およびシグナルペプチド切断部位をシグナルペプチド予測サーバーSignalP 4.0により推測した。その結果、開始コドンに由来するメチオニン（Met1）から16番目のアラニン（Ala16）までの配列がシグナルペプチドとして同定された。また、図10に示すアミノ酸配列において、FAD結合に重要なFAD結合モチーフ（Gly-Gly-Gly-Thr-Ser-Gly）は完全に保存されていた。

[0109] さらに、Th. crustaceus由来FADGDHのアミノ酸配列（図10）を、Aspergillus属糸状菌由来FADGDHと比較したところ、Aspergillus oryzae由来FADGDHと55%の相同性を有し、Aspergillus terreus由来FADGDHと56%の相同性を有していた（図7）。なお、Ta. emersonii由来FADGDHのアミノ酸配列（図6）と、Th. crustaceus由来FADGDHのアミノ酸配列（図10）とは、62%の相同性を有していた。

[0110] （3）Th. crustaceus由来FADGDH遺伝子発現型プラスミドの作製

Th. crustaceus由来FADGDH遺伝子のコーディング領域をOverlap extension PCRにより合成した。

[0111] まず、各エキソンをPCR増幅した。エキソン1のPCR増幅には、プラ

イマーとして、9129GSP11 (5' - GCAATGTTGCTCC
CCCTTTCCCTCCTCTCC -3') と9129E1A (5' -
GGCCATGCCGTTGATGGTGCTGGTGCCTCC-3'
) を用いた。エキソン2のPCR増幅には、プライマーとして、9129E
2S (5' - ATCAACGGCATGGCCTATACCCGTGCG
GAG -3') と9129E2A (5' - GAGGACAGTTGGG
TTACCAACACCAGAGCG-3') を用いた。エキソン3のPC
R増幅には、プライマーとして、9129E3S (5' - AACCCAAC
TGTCCTCAGCCGCTTCGGCATT-3') と9129E3A (5'
- GGAACGAGAGACAGAGCTGATCCACTGAGC
-3') を用いた。エキソン4のPCR増幅には、プライマーとして、912
9E4S (5' - TCTGTCTCTCGTTCCAACCTTCCACC
CCGTC -3') と9129GSP12 (5' - CCCTTAGAC
CTGACCGGCCTTGATGAGGTC -3') を用いた。

[0112] 増幅したエキソン1とエキソン2をOverlap extension
PCRにより連結し、また同時にエキソン3とエキソン4もOverla
p extension PCRにより連結した。Overlap ext
ension PCRにより合成した両DNA断片を再度Overlap
extension PCRにより連結し、Th. crustaceus
由来FADGDH遺伝子のコーディング領域を合成した。

[0113] 次に、Th. crustaceus由来FADGDH遺伝子コーディング
領域を鋳型として、発現型プラスミド作製用プライマーである9129Es
c2 (5' -AAACATATGACCTCCTATGACTACATTA
TC-3') および9129Esc4 (5' -TTTAAGCTTTTAG
TGGTGGTGGTGGTGGTGGACCTGACCGGCCTTGA
TGAG-3') を用いたPCRを行ない、成熟型FADGDHをコードす
る遺伝子を増幅した。なお、増幅したTh. crustaceus成熟型F
ADGDHをコードする遺伝子のC末端側にはヒスチジンタグを融合するた

めのヒスチジンのコドン (CAC) が付加されている。

[0114] 増幅したDNA断片をNde IおよびHind IIIで切断した後に、大腸菌用発現ベクターpET-21b (+) (Novagen)の同一制限酵素サイトに連結することにより、Th. crustaceus由来FADGDH遺伝子発現型プラスミドを作製した。

[0115] (4) Th. crustaceus由来FADGDH遺伝子の大腸菌における発現と組換え酵素の精製

Th. crustaceus由来FADGDH遺伝子発現型プラスミドを大腸菌BLR (DE3)株 (Novagen)に導入した。発現型プラスミドを保有するBLR (DE3)をLB培地 (100 μg/mLアンピシリン含有)で一晩培養した (前培養)。本培養用LB培地 (100 μg/mLアンピシリン含有)に前培養液を1%植菌し、4時間ほど37℃で好氣的に培養した。その後、イソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド (IPTG)を終濃度0.1%となるように添加し、25℃で約20時間培養を続けた。

[0116] 培養後の大腸菌を集菌し、PBS緩衝液に懸濁することにより菌体を洗浄した。遠心分離により、再度集菌した菌体をPBSに懸濁した。PBS緩衝液に懸濁した菌体は超音波により破碎した。超音波破碎後の破碎液を遠心分離 (8000 g、10分間、4℃)することにより上清 (全菌体画分)と沈殿 (未破碎菌体)を分離した。全菌体画分をさらに遠心分離 (12000 g、20分間、4℃)し、可溶性画分と不溶性画分とに分画した。可溶性画分をPBS緩衝液で平衡化したNi-NTA Agarose (QIAGEN)カラム (直径0.7 cm、高さ1.0 cm)に供した。カラムをPBS緩衝液で洗浄した後に、吸着したタンパク質を100 mMイミダゾールを含む20 mM Hepes-NaOH緩衝液 (pH 7.5)で溶出した。

[0117] 溶出画分を20 mM Hepes-NaOH緩衝液 (pH 7.5)で平衡化したQ Sepharose Fast Flow (GE Healthcare)カラム (直径0.7 cm、高さ2.5 cm)に供した。カラムを

20 mM H e p e s - N a O H 緩衝液 (pH 7. 5) で洗浄した後に、吸着したタンパク質を 100 mM N a C l を含む 20 mM H e p e s - N a O H 緩衝液 (pH 7. 5) で溶出した。溶出画分を A m i c o n U l t r a - 1 5 M W C O 1 0 (M i l l i p o r e) を用いて脱塩処理を施し、20 mM H e p e s - N a O H 緩衝液 (pH 7. 5) で平衡化した R e s o u r c e Q 1 m L (G E H e a l t h c a r e) に供した。吸着したタンパク質は 0 ~ 1. 0 M N a C l の直線濃度勾配 (20 カラム体積) により溶出した。溶出画分を A m i c o n U l t r a - 4 M W C O 1 0 (M i l l i p o r e) を用いて脱塩処理を施し、T h. c r u s t a c e u s 由来 F A D G D H 精製標品とした。

[0118] なお、シグナルペプチドをコードする遺伝子を付加した T h. c r u s t a c e u s 由来 F A D G D H 遺伝子発現型プラスミドを作製し大腸菌における発現を試みたが、T h. c r u s t a c e u s 由来 F A D G D H は、大腸菌細胞内で不溶性インクルージョンボディとして生産された。

[0119] (実施例 4)

< S D S - P A G E >

実施例 2 および 3 で得られた F A D G D H 精製標品 (大腸菌で発現し、精製された T a. e m e r s o n i i 由来 F A D G D H および T h. c r u s t a c e u s 由来 F A D G D H を含む溶液) 中のタンパク質濃度を測定した。タンパク質濃度は、市販のタンパク質定量キット (P i e r c e B C A P r o t e i n A s s a y R e a g e n t ; サーマフィッシャーサイエンティフィック株式会社) を用いた B C A 法により測定した。なお、該キットでは、標準タンパク質としては牛血清アルブミンを使用している。得られた濃度測定値に基づいて、F A D G D H 5 μ g を含む精製標品を、S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (S D S - P A G E) に供した。

[0120] S D S - P A G E は L a e m m l i の方法に準じて行なった。S D S - ポリアクリルアミドゲルとしては、「e - P A G E L 12. 5 %」 (アトー株式会社) を使用した。泳動後のゲルは C B B (Coomassie Brilliant Blu

e) ベースの染色液「Gel Code Blue Safe Protein Stain」（サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社）により染色した。タンパク質マーカーには、「Protein Ladder（10-250 kDa）」（New England BioLabs）を使用した。

[0121] SDS-PAGEの結果を図11に示す。図11に示されるように、*Ta. emersonii*由来FADGDHおよび*Th. crustaceus*由来FADGDHの両者共に、電気泳動的に単一な精製標品の取得に成功したことがわかった。

[0122] （実施例5）

＜吸収スペクトル計測＞

実施例2および3で得られたFADGDH精製標品（大腸菌で発現し、精製された*Ta. emersonii*由来FADGDHおよび*Th. crustaceus*由来FADGDHを含む溶液）を実施例4での濃度測定値に基づいて希釈し、500 μ g/mLの酵素溶液（FADGDH溶液）を調製した。該FADGDH溶液の吸収スペクトルを、UV／可視分光光度計DU-800（Beckman Coulter）用いて計測した。また、上記FADGDH溶液にグルコースを終濃度100 mMとなるように添加した溶液、および、上記FADGDH溶液に還元剤である亜二チオン酸ナトリウム粉末を添加した溶液についても同様に吸収スペクトルを計測した。得られた吸収スペクトルを図12（*Ta. emersonii*由来FADGDH）、図13（*Th. crustaceus*由来FADGDH）に示す。

[0123] 図12および13に示されるように、FADGDH溶液の吸収スペクトルでは、典型的なFAD由来のピークが観察された（図12および13の「FADGDH」）。一方、グルコース添加後のFADGDH溶液の吸収スペクトルでは、FADに由来するピーク（350～500 nmの吸収ピーク）が消失した（図12および13の「FADGDH+グルコース」）。亜二チオン酸ナトリウム添加後のFADGDH溶液の吸収スペクトルでも、FADに

由来するピークは消失した（図12および13の「FADGDH+亜二チオン酸ナトリウム」）。

[0124] これらの結果から、大腸菌にて発現し、精製されたFADGDH（*Ta. emersonii*由来FADGDH、および、*Th. crustaceus*由来FADGDH）は、両者共に補酵素として酸化型FADを含んだホロ型酵素として精製されたことが分かる。したがって、大腸菌によって生産された本発明の好熱性糸状菌由来のFADGDHは、補酵素の添加を必要とせずにグルコース濃度測定試薬などとして使用できるというFADGDHの利点を有している。

[0125] （実施例6）

本実施例では、*Ta. emersonii*由来FADGDHを酵母（*Pichia pastoris*）を用いて製造した。以下、詳細について説明する。

[0126] まず、*Ta. emersonii*由来FADGDH遺伝子コーディング領域を鋳型として、分泌発現型プラスミド作製用プライマー31232Pic1（5'-AAAGAATTCTCGCTCCGCTGTGCCAGACTGCC-3'）および31232Pic2（5'-TTTGCGGCCGCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGATTGCCCAATCTGGCCGCATC-3'）を用いたPCRを行ない、成熟型FADGDHをコードする遺伝子を増幅した。なお、増幅した*Ta. emersonii*成熟型FADGDHをコードする遺伝子のC末端側にはヒスチジンタグを融合するためのヒスチジンのコドン（CAC）が付加されている。増幅したDNA断片をEcoRIおよびNotIで切断した後に、*P. pastoris*（*Pichia pastoris*）用分泌発現ベクターpPIC9（Life Technologies）の同一制限酵素サイトに連結することにより、*Ta. emersonii*由来FADGDH遺伝子分泌発現型プラスミドを作製した。成熟型FADGDHをコードする遺伝子をpPIC9に連結することにより、成熟型FADGDHをコードする遺伝子の上流には酵母用シグ

ナル配列が融合されている。

[0127] *Ta. emersonii* 由来 FADGDH 遺伝子分泌発現型プラスミドを *P. pastoris* GS115 株 (Life Technologies) に導入した。分泌発現型プラスミドを導入した GS115 株を BMG 培地 (100 mM リン酸カリウム緩衝液: pH 6.0、1.34% 酵母ニトロゲンベース、 4×10^{-5} % ビオチン、1% グリセロール) で 2 日間培養した (前培養)。前培養により取得した菌体を BMM 培地 (100 mM リン酸カリウム緩衝液: pH 6.0、1.34% 酵母ニトロゲンベース、 4×10^{-5} % ビオチン、0.5% メタノール) に植菌し、5 日間ほど 30°C で好氣的に培養した。

[0128] 培養後の培養上清を回収し、PBS 緩衝液に対して透析を行なった。透析後の培養上清を PBS 緩衝液で平衡化した Ni-NTA Agarose (QIAGEN) カラム (直径 2.0 cm、高さ 2.0 cm) に供した。カラムを PBS 緩衝液で洗浄した後に、吸着したタンパク質を 200 mM イミダゾールを含む 20 mM Hepes-NaOH 緩衝液 (pH 7.5) で溶出した。溶出画分を Amicon Ultra-4 MWCO10 (Millipore) を用いて脱塩処理を施し、*Ta. emersonii* 由来 FADGDH 精製標品とした。

[0129] (実施例 7)

本実施例では、*Th. crustaceus* 由来 FADGDH を酵母 (*Pichia pastoris*) を用いて製造した。以下、詳細について説明する。

[0130] まず、*Th. crustaceus* 由来 FADGDH 遺伝子コーディング領域を鋳型として、分泌発現型プラスミド作製用プライマー 9129 Pic1 (5'-AAAGAATTTCACCTCCTATGACTACATTATC-3') および 9129 Pic2 (5'-TTTGCGGCCGCTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGACCTGACCGGCCTTGATGAG-3') を用いた PCR を行ない、成熟型 FADGDH をコードする

遺伝子を増幅した。なお、増幅した *Th. crustaceus* 成熟型 FADGDH をコードする遺伝子の C 末端側にはヒスチジントグを融合するためのヒスチジンのコドン (CAC) が付加されている。増幅した DNA 断片を *EcoRI* および *NotI* で切断した後に、*P. pastoris* 用分泌発現ベクター pPIC9 (Life Technologies) の同一制限酵素サイトに連結することにより、*Th. crustaceus* 由来 FADGDH 遺伝子分泌発現型プラスミドを作製した。成熟型 FADGDH をコードする遺伝子を pPIC9 に連結することにより、成熟型 FADGDH をコードする遺伝子の上流には酵母用シグナル配列が融合されている。

[0131] *Th. crustaceus* 由来 FADGDH 遺伝子分泌発現型プラスミドを *P. pastoris* GS115 株 (Life Technologies) に導入した。分泌発現型プラスミドを導入した GS115 株を BMG 培地 (100 mM リン酸カリウム緩衝液 pH 6.0、1.34% 酵母ニトロゲンベース、 4×10^{-5} % ビオチン、1% グリセロール) で 2 日間培養した (前培養)。前培養により取得した菌体を BMM 培地 (100 mM リン酸カリウム緩衝液 pH 6.0、1.34% 酵母ニトロゲンベース、 4×10^{-5} % ビオチン、0.5% メタノール) に植菌し、5 日間ほど 30°C で好氣的に培養した。

培養後の培養上清を回収し、PBS 緩衝液に対して透析を行なった。透析後の培養上清を PBS 緩衝液で平衡化した Ni-NTA Agarose (QIAGEN) カラム (直径 2.0 cm、高さ 2.0 cm) に供した。カラムを PBS 緩衝液で洗浄した後に、吸着したタンパク質を 200 mM イミダゾールを含む 20 mM HEPES-NaOH 緩衝液 (pH 7.5) で溶出した。溶出画分を Amicon Ultra-4 MWCO10 (Millipore) を用いて脱塩処理を施し、*Th. crustaceus* 由来 FADGDH 精製標品とした。

[0132] (実施例 8)

<SDS-PAGE>

実施例6および7で得られたFADGDH精製標品 (*P. pastori*sにて発現し、精製された*Ta. emersonii*由来FADGDHおよび*Th. crustaceus*由来FADGDH) について、FADGDH精製液中のタンパク質濃度を実施例4と同様にして測定した。この濃度測定値に基づいて、FADGDH 5 μ gを含む精製標品を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) に供した。

[0133] SDS-PAGEはLaemmliの方法に準じて行なった。SDS-ポリアクリルアミドゲルとしては、「e-PAGE L 12.5%」(アトー株式会社)を使用した。泳動後のゲルはCBB (Coomassie Brilliant Blue) ベースの染色液「Gel Code Blue Safe Protein Stain」(サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社)により染色した。タンパク質マーカーには、「Protein Ladder (10-250 kDa)」(New England BioLabs)を使用した。

[0134] また、別途、染色液として、PAS (Periodic acid-Schiff stain) 染色液を用いる以外は、同様にSDS-PAGEを行った。なお、PAS染色液は、糖を選択的に酸化してアルデヒドを生成し、シッフ試薬によって赤紫色に変色する。

[0135] SDS-PAGEの結果を図14に示す。なお、図の左側がCBBベースの染色液を用いた場合、図の右側がPAS染色液を用いた場合の結果である。図14(左側)に示されるように、*Ta. emersonii*由来FADGDHおよび*Th. crustaceus*由来FADGDHの両者共に、電気泳動的に単一の精製標品の取得に成功したことがわかった。また、図14(右側)に示されるように、これらの精製標品は、いずれも糖鎖付加されたタンパク質 (FADGDH) であることが分かった。

[0136] (実施例9)

<吸収スペクトル計測>

実施例6および7で得られたFADGDH精製標品 (*P. pastori*

sにて発現し、精製された*Ta. emersonii*由来FADGDHおよび*Th. crustaceus*由来FADGDH)を実施例8での濃度測定値に基づいて希釈し、2mg/mLの酵素溶液(FADGDH溶液)を調製した。該FADGDH溶液の吸収スペクトルを、UV/可視分光光度計DU-800(Beckman Coulter)用いて計測した。また、上記FADGDH溶液にグルコースを終濃度150mMとなるように添加した溶液、および、上記FADGDH溶液に還元剤である亜二チオン酸ナトリウム粉末を添加した溶液についても同様に吸収スペクトルを計測した。得られた吸収スペクトルを図15(*Ta. emersonii*由来FADGDH)、図16(*Th. crustaceus*由来FADGDH)に示す。

[0137] 図15および16に示されるように、FADGDH溶液の吸収スペクトルでは、典型的なFAD由来のピークが観察された(図15および16の「FADGDH」)。一方、グルコース添加後のFADGDH溶液の吸収スペクトルでは、FADに由来するピーク(350~500nmの吸収ピーク)が消失した(図15および16の「FADGDH+グルコース」)。亜二チオン酸ナトリウム添加後のFADGDH溶液の吸収スペクトルでも、FADに由来するピークは消失した(図15および16の「FADGDH+亜二チオン酸ナトリウム」)。

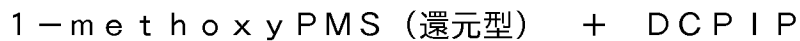
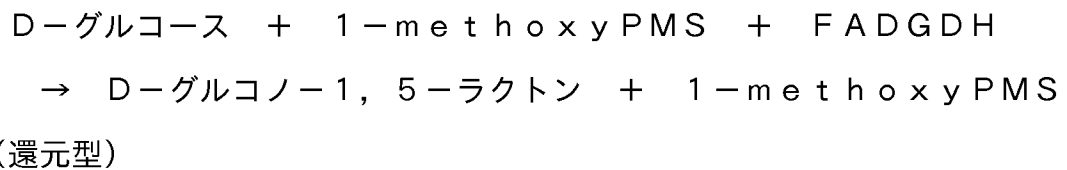
[0138] これらの結果から、酵母(*P. pastoris*)にて発現し、精製されたFADGDH(*Ta. emersonii*由来FADGDH、および、*Th. crustaceus*由来FADGDH)は、補酵素として酸化型FADを含んだホロ型酵素として精製されたことが分かる。したがって、酵母によって生産された本発明の好熱性糸状菌由来のFADGDHは、補酵素の添加を必要とせずにグルコース濃度測定試薬などとして使用できるというFADGDHの利点を有している。

[0139] (実施例10)

本実施例では、実施例2および3で得られたFADGDH精製標品(大腸菌で発現し、精製された*Ta. emersonii*由来FADGDHおよび

*Th. crustaceus*由来FADGDHを含む溶液)、ならびに、実施例6および7で得られたFADGDH精製標品(*P. pastoris*にて発現し、精製された*Ta. emersonii*由来FADGDHおよび*Th. crustaceus*由来FADGDH)について(計4種のFADGDH精製標品)、FADGDHの酵素活性に関する以下の各種特性(pH安定性、pH依存性、温度安定性、温度依存性、基質特異性、グルコースセンサーチップでの応答性)に関する評価試験を行った。なお、本実施例における酵素活性測定原理、酵素活性の定義、活性測定方法は次のとおりである。

[0140] [酵素活性測定原理]



還元型1-メトキシフェナジンメトサルフェート(1-methoxyPMS)による2, 6-ジクロロフェノリンドフェノール(DCPIP)の還元により生じた還元型DCPIP量は、分光光度計を用いて600nmの吸光度を測定することにより計測した。また、基質特異性の検討においては、D-グルコースを他の糖類に変更し、それぞれの糖類(基質)に対する酵素活性を測定した。

[0141] [酵素活性の定義]

酵素の活性(FADGDH活性)は、37℃、pH7.0の条件下において還元型DCPIPを1分あたりに1マイクロモル形成させるFADGDH量を1ユニットとして定義する。

[0142] 具体的に、FADGDH活性は、後述の吸光度変化(ΔOD_{TEST} 、 ΔOD_{BLANK})から以下の式により求められる。

[0143]

$$\begin{aligned} & \text{FADGDH活性 (U/mL)} \\ &= [(\Delta OD_{\text{TEST}} - \Delta OD_{\text{BLANK}}) \times 3.1] / (16.3 \times 0.1 \times \text{希釈率}) \end{aligned}$$

なお、式中の各定数は、

3.1 : FADGDH溶液混和後の反応液の容量 (mL)

16.3 : DCPIPのミリモル分子吸光係数 ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

0.1 : FADGDH溶液の容量 (mL)

である。

[0144] [活性測定方法]

(1) キュベット内で以下の組成で反応液を混合する。

0.1 M リン酸カリウムバッファー (pH 7.0)	1.5 mL
1 M グルコース溶液	0.9 mL
1.75 mM 2,6-Dichlorophenolindophenol (DCPIP)	0.12 mL
20 mM 1-Methoxy-5-methylphenazium methylsulfate (1-mPMS)	0.021 mL
10% Triton X-100	0.06 mL
H ₂ O	0.399 mL

(2) 37℃で10分間ブレインキュベートする。

(3) FADGDH溶液を0.1 mL加えて転倒混和し、37℃で反応させる。この間、吸光光度計を用いて600 nmでの吸光度を記録し、1分間あたりの吸光度変化 (ΔOD_{TEST}) を算出する。

(4) 対照として、酵素液（上述の反応液にFADGDH溶液を加えた液

）の代わりに等量の酵素希釈用液（50 mMのリン酸バッファー（pH 7.0）に0.01%のTriton X-100を添加した液）について、（3）と同様に吸光度変化を記録し、1分間あたりの吸光度変化（ ΔOD_{BLANK} ）を算出する。

[0145] <pH安定性>

ここでは、酵素活性のpH安定性の評価を行った。まず、実施例2および3で得られたFADGDH精製標品（大腸菌で発現し、精製された*Ta. emersonii*由来FADGDHおよび*Th. crustaceus*由来FADGDHを含む溶液）、ならびに、実施例6および7で得られたFADGDH精製標品の4種の精製標品各々について、上記活性測定方法により酵素活性を測定した。それらの測定値に基づいて各精製標品を水で希釈することで、酵素活性が14 U/mLとなるような酵素溶液（FADGDH溶液）を調製した。

[0146] これらのFADGDH溶液に対して、所定のpHに調整された0.1 MのBritton-Robinson広域緩衝液を等量混合し、pHを2.0～11.0の範囲で変化させた複数の酵素溶液を調製し、各酵素溶液の調製直後の酵素活性を測定した。次に、各試料溶液を25℃で20時間インキュベートした後に酵素活性を測定して、インキュベート前の酵素活性に対するインキュベート後の酵素活性の割合（残活性率）を求めた。結果を図17（*Ta. emersonii*由来FADGDH）および図18（*Th. crustaceus*由来FADGDH）に示す。

[0147] 図17において、*Ta. emersonii*由来FADGDHの場合、大腸菌で発現した糖鎖が付加していないもの（以下、「non glycosylated」と表記する。）では、pH 3.0～7.0で安定で、pH 7.0～8.0で残活性率90%以上を示した。酵母で発現した糖鎖が付加しているもの（以下、「glycosylated」と表記する。）では、pH 2.0～9.0の広範囲にわたって安定であった。また、図18において、*Th. crustaceus*由来FADGDHの場合も、*Ta. emersonii*由来FADGDHの

場合とほぼ同様の傾向が示された。

[0148] < pH依存性 >

ここでは、酵素活性の pH 依存性の評価を行った。上記 pH 安定性の評価試験と同様にして、酵素活性が 0.2 U/mL となるような酵素溶液 (FADGDH 溶液) を調製した。pH を 3.0 ~ 10.0 の範囲で変化させた複数の酵素活性測定溶液を調製し、それぞれの pH 条件における酵素活性を測定した。最も活性が高かった pH 条件における酵素活性を 100 (%) とし、他の各 pH 条件における酵素活性の比率を相対活性として求めた。結果を図 19 (Ta. emersonii 由来 FADGDH) および図 20 (Th. crustaceus 由来 FADGDH) に示す。

[0149] 図 19 において、Ta. emersonii 由来 FADGDH は、「glycosylated」では pH 5.0、「non glycosylated」では pH 6.0 が至適 pH であり、pH 3.0 ~ 10.0 の広範囲で 50% 以上の相対活性を保っていることが示された。また、図 20 において、Th. crustaceus 由来 FADGDH は、糖鎖付加にかかわらず、pH 5.0 で最も高い活性を示し、酸性領域で高い酵素活性をもつことが示された。

[0150] < 温度安定性 >

ここでは、酵素活性の温度安定性の評価を行った。まず、上記 pH 安定性の評価試験と同様にして、酵素活性が 7 U/mL となるように酵素溶液 (FADGDH 溶液) を調製した。これらの FADGDH 溶液をマイクロチューブに分注し、PCR マシンを用いて 40°C ~ 70°C の範囲の数種の温度で 15 分間加熱した。加熱前後の酵素活性を測定し、加熱前の酵素活性に対する加熱後の酵素活性の比率 (残活性率) を求めた。結果を図 21 (Ta. emersonii 由来 FADGDH) および図 22 (Th. crustaceus 由来 FADGDH) に示す。

[0151] 図 21 において、Ta. emersonii 由来 FADGDH (glycosylated) は 60°C でも約 90% の活性を保持しており、熱安定性が極めて高いことが示された。また、Ta. emersonii 由来 FADGDH (non gl

ycosylated) は、60℃ではほぼ活性を失っていたが、45℃以下では極めて高い安定性を示し、50℃でも80%以上の活性を保持していた。さらに、図22において、Th. crustaceus由来FADGDH (glycosylated) は60℃でも80%近くの活性を保持しており、熱安定性が極めて高いことが示された。また、Th. crustaceus由来FADGDH (non glycosylated) は、60℃ではほぼ活性を失っていたが、45℃以下では極めて高い安定性を示し、50℃でも70%近くの活性を保持していた。なお、天然のTh. crustaceus、Ta. emersoniiは糖鎖付加をする真核生物であるため、天然の酵素も高い熱安定性を示すことが推測される。

[0152] これらの結果から、本発明のFADGDH活性を有するタンパク質は、特に糖鎖が付加された場合に極めて高い熱安定性を有していることが分かる。また、糖鎖が付加されていない場合でも、通常の物流輸送等における温度環境に対しては十分な熱安定性を有していると考えられる。

[0153] <温度依存性>

ここでは、酵素活性の温度依存性の評価を行った。まず、上記pH安定性の評価試験と同様にして、酵素活性が0.05~0.2 U/mLとなるように酵素溶液 (FADGDH溶液) を調製した。これらのFADGDH溶液について、4℃~75℃の範囲で酵素活性を測定し、37℃での活性を100 (%) としたときの相対活性を求めた。結果を図23 (Ta. emersonii由来FADGDH) および図24 (Th. crustaceus由来FADGDH) に示す。

[0154] 図23に示されるように、Ta. emersonii由来FADGDHの場合、「non glycosylated」では、55℃~60℃で活性がピークとなり、それ以上の高温域では活性が低下した。「glycosylated」では、55℃までは「non glycosylated」とほぼ同じ活性を示すがそれ以上の高温域でも活性が上昇し、65℃~70℃で活性がピークとなりそれ以上の温度で活性が低下した。また、図24に示されるように、Th. crustaceus由来

FADGDHの場合、「non glycosylated」では、45℃～60℃で活性がピークとなり、それ以上の高温域では活性が低下した。「glycosylated」では、45℃までは「non glycosylated」とほぼ同じ活性を示すがそれ以降も活性が上昇して60℃～65℃でピークとなり、それ以上の高温域では活性が低下した。なお、「glycosylated」では、37℃の時に比較してピークの時に*Th. crustaceus*で3倍以上、*Ta. emersonii*では4倍以上の活性が見られた。

[0155] <基質特異性>

ここでは、グルコース以外の糖類を基質とするかどうかを確認した。まず、グルコース濃度が40mMの場合に十分な酵素活性が得られる酵素濃度に、それぞれの酵素溶液（FADGDH溶液）を調製した。これらのFADGDH溶液について、上記活性測定方法を上記反応液中の糖類の濃度が40mMとなるように変更し、酵素活性を測定した。測定は、表2に示す14種類の糖類について行った。なお、酵素が含まれない場合を対照とし、それぞれの糖に対して対照をとった。グルコースについて酵素活性の測定値を100（%）としたときの他の各糖類の相対活性を算出し、表2にまとめた。なお、DCPIP吸光度の変化量が対照と比較して有意差がないものに関しては活性がないと判断し、0.0と表記した。

[0156]

[表2]

基質 (40mM)	Ta. emersonii		Th. crustaceus	
	glycosylated	non glycosylated	glycosylated	non glycosylated
D-Glucose	100	100	100	100
D-Arabinose	0.0	0.0	0.0	0.0
D-Fructose	0.0	0.0	0.0	0.0
D-Galactose	0.0	0.0	0.0	0.0
2-deoxy-D-Glucose	11.5	17.7	60.1	49.8
Maltose	0.0	0.0	0.0	0.0
Maltotetraose	0.0	0.0	0.0	0.0
Maltotoriose	3.4	2.7	0.0	0.0
D-Mannitol	0.0	0.0	0.0	0.0
D-Mannose	0.0	0.0	6.8	5.6
D-Raffinose	0.0	0.0	0.0	0.0
D-Sorbitol	0.0	0.0	0.0	0.0
Sucrose	0.0	0.0	0.0	0.0
D-Trehalose	0.0	0.0	0.0	0.0
D-Xylose	24.8	24.6	27.6	21.7

[0157] 表2に示す結果において、調べた14種類の糖類のうち、D-アラビノース、D-フルクトース、D-ガラクトース、マルトース、マルトテトラオース、D-マンニトール、D-ラフィノース、D-ソルビトール、スクロースおよびD-トレハロースに対しては、Ta. emersonii由来FADGDHおよびTh. crustaceus由来FADGDHの両者とも反応しないことが示された。マルトトリオースに対しても、Th. crustaceus由来FADGDHは反応せず、Ta. emersonii由来FADGDHはわずかに反応がみられる程度であった。D-マンノースに対しても、Ta. emersonii由来FADGDHは反応せず、Th. crustaceus由来FADGDHはわずかに反応がみられる程度であった。なお、2-デオキシ-D-グルコースとD-キシロースについては、両者のFADGDHで基質として認識されていたが、マルトースのように医療用の輸液等に含まれる成分ではなく、血中に存在したとしても通常はグルコース量と比較して無視できる程度の微量であるため、グルコースセンサ等に用いる上での支障は少ないと考えられる。

[0158] <グルコースセンサーチップでの応答性>

絶縁性基板上に作用電極、対極を配した電極基盤を作製し、粘着層を利用して反応層を規定した。その電極表面に、上記の組換えFADGDH精製標品とメディエーター（フェリシアン化カリウム）塗布し、自然乾燥させ、カバー層を重ねて個片化しセンサーチップを作製した。なお、上記4種の組換えFADGDHの各々を用いた4種のチップを作製した。

[0159] pH 7.4のリン酸カリウムバッファーを溶媒とする0～600 mg/dLのグルコース溶液を調製し、このグルコース溶液1 μ Lを試料導入口からチップに導入した時に生じる電流値を測定し、各測定値をグルコース濃度に対してプロットした。そのプロットに対し、0～600 mg/dLの範囲において、最小二乗法により回帰直線を引いた。結果を図25（*Ta. emersonii*由来FADGDH: glycosylated）、図26（*Ta. emersonii*由来FADGDH: non glycosylated）、図27（*Th. crustaceus*由来FADGDH: glycosylated）、および、図28（*Th. crustaceus*由来FADGDH: non glycosylated）に示す。

[0160] 図25～図28において、それぞれ R^2 （決定係数：相関係数 R の二乗）は1.000、1.000、0.994、0.996であり、ほぼ1であることから、非常に直線性が高いことが示された。したがって、大腸菌での発現か酵母での発現かにかかわらず、*Ta. emersonii*由来FADGDHおよび*Th. crustaceus*由来FADGDHを用いて、精度よくグルコース濃度を定量できることが示唆される。

請求の範囲

- [請求項1] 好熱性糸状菌由来のタンパク質であって、フラビンアデニンジヌクレオチド依存型グルコース脱水素酵素活性を有するタンパク質。
- [請求項2] 以下の（a）～（d）のいずれかのタンパク質。
- （a） 配列番号 1 または 2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、
- （b） 配列番号 1 または 2 に記載のアミノ酸配列からシグナルペプチドを除いたアミノ酸配列からなるタンパク質、
- （c） 上記（a）または（b）のタンパク質のアミノ酸配列において、1 もしくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加または挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質、
- （d） 上記（a）～（c）のいずれかのタンパク質のアミノ酸配列と 70% 以上の相同性を有し、かつ、フラビンアデニンジヌクレオチド依存型グルコース脱水素酵素活性を有するタンパク質。
- [請求項3] 配列番号 5 ～ 7 の塩基配列、ならびに、配列番号 8 および 9 の塩基配列に相補的な塩基配列からなる群から選択される少なくとも 1 つの塩基配列でコードされるアミノ酸配列を含み、かつ、フラビンアデニンジヌクレオチド依存型グルコース脱水素酵素活性を有するタンパク質。
- [請求項4] 好熱性糸状菌由来である、請求項 2 または 3 に記載のタンパク質。
- [請求項5] 前記好熱性糸状菌は、*Talaromyces emersonii* または *Thermoascus crustaceus* である、請求項 1 または 4 に記載のタンパク質。
- [請求項6] 糖鎖が付加された、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。
- [請求項7] 請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載のタンパク質をコードする遺伝子。
- [請求項8] 以下の（A）～（D）のいずれかの DNA からなる遺伝子。

(A) 配列番号 3 または 4 に記載の塩基配列からなる DNA、

(B) 配列番号 3 または 4 に記載の塩基配列からシグナルペプチドをコードする塩基配列を除いた塩基配列からなる DNA、

(C) 上記 (A) または (B) の DNA の塩基配列と、イントロンとを含む DNA、

(D) 上記 (A) ~ (C) のいずれかの DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつフラビンアデニンジヌクレオチド依存型グルコース脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードする DNA。

[請求項9] 請求項 7 または 8 に記載の遺伝子を含む組換えベクター。

[請求項10] 請求項 7 または 8 に記載の遺伝子を含む形質転換体。

[請求項11] 請求項 7 または 8 に記載の遺伝子を用いたフラビンアデニンジヌクレオチド依存型グルコース脱水素酵素の製造方法。

[請求項12] 請求項 10 に記載の形質転換体を用いたフラビンアデニンジヌクレオチド依存型グルコース脱水素酵素の製造方法。

[請求項13] 請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のタンパク質を含むグルコース濃度測定試薬。

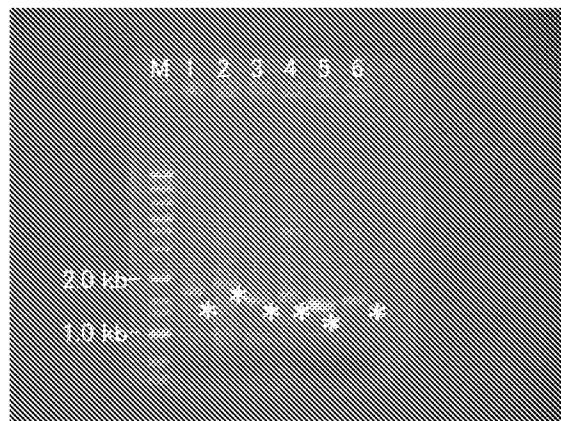
[請求項14] 請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のタンパク質を用いたグルコースセンサ。

[請求項15] 請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のタンパク質を用いたグルコース濃度測定方法。

[請求項16] 請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のタンパク質を用いたバイオ燃料電池。

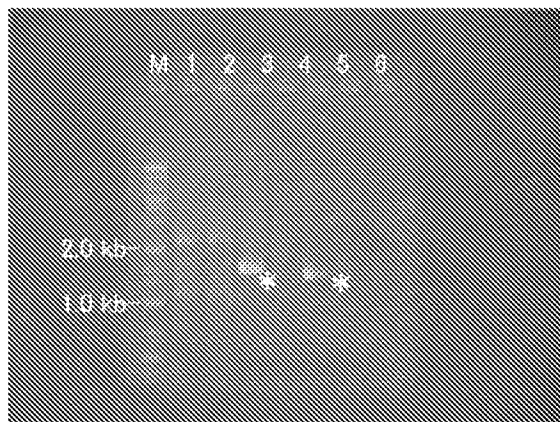
[図1]

FIG.1

*Ta. emersonii* (NBRC31232)

[図2]

FIG.2

*Th. crustaceus* (NBRC9129)

[図3]

FIG.3

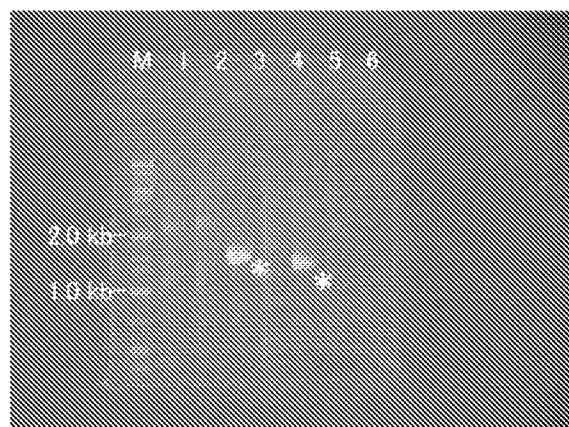
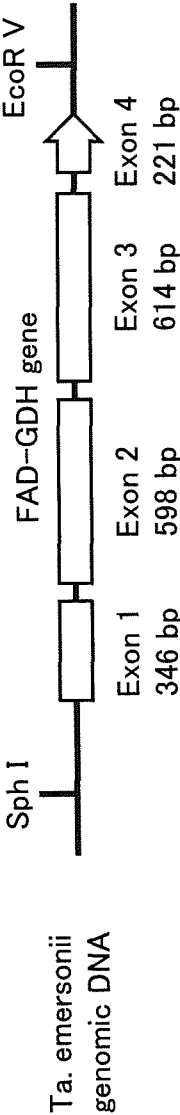
*Th. crustaceus* (NBRC9816)

FIG. 4

[illegible]

[図5]

FIG.5



[図6]

FIG.6

シゲナル配列

FAD結合モチーフ

1 AIGCTGCGCGGACGGTIGGCAICCTCGCGGIGCTGICCGTGGGCTCIGAGCTCCGCTGTGCCAGACTGCCCTCCAGCTCGTATACATCGTCTCGCGCGGACCCAGCGGTCTG
 M L R R T V G I L A V L S L A S A A P L C Q T A S S S Y D Y I V V G G G T S G L
 121 GTGTCGCAAAACGGCTGTCCGAAATCCGAACGTGTCGTCCTGGTCTCATCGAGCGCGGACTCGGTCTACAACAATGCCAAGTGAACAAGTCAATGGCTACGGACTGGCTTTGGG
 V V A N R L S E N P N V S V L V I E A G D S V Y N N A N V T N V N G Y G L A F G
 241 ACGCCCATCGACTGGCAGTACCAATCCACCAACAGACCTACGCTGGCAACACGCGGAGAGCGTCCGTGCTGGCAAGCCCTGGGAGGACGACGATCAATGGATGGCTATACG
 T P I D W Q Y Q S T N Q T Y A G N T R Q T L R A G K A L G G T S T I N G M A Y T
 361 CCGGCCCAAGACGTCAGATCGATGCTGGCGGCGATCGGGAATGACGGCTGGGACTGGAGCTCGCTCTGGCGGTACTATCTCAAGAGCGAGGCAATTCACCGCGCGCAACGACGCA
 R A Q D V Q I D A W A A I G N D G W S S L W P Y Y L K S E A F T A P N Q T Q
 481 CCGGAGCGCGGTGCTTCTTACAACCGGCTACGACGGAGTGACCGGAGCTCTGCATGTGGGCTTCATCGAGATGCAGCCCAACAACCTGCTTCGATTCTGAACGACGCTACCGGCT
 R A A G A S Y N P A Y H G V T G P L H V G F I E M Q P N N L S S I L N Q T Y Q A
 601 CTCGGGTTCCGTGGACGGAAGACGTCAACGGAGGAAGATCGGTGGCTACAACCTTCTCCGCTCGACGGTCCAGCATGCAGCAGATGTTCCGGAAGATGCTGCTGCTTACTACTAC
 L G V P W T E D V N G G K M R G Y N F F P S T V D D A A D V R E D A A R A Y Y Y
 721 CCGTTGAGTCCGCGCGAATCTGAGGTCATGCTGAACACGCTCGCAACCGGATTGCTGGAAGAATGAGACGAGCGGCGGAATGTCACTCGGACGGAGTGAAGTCACTCCGCTC
 P F E S R P N L R V M L N T L A N R I V W K N E T S G G N V T A D G V E V T P L
 841 AATGGACCGCTGTAGGATTCAGGCAACAACAGGTCAATCTGTGCGCTGGTCTCTCTCGCTCGCGGGGATTTTGGAACTCTCTGGGTTGGGAATCCAGGCAATCTGAACAATAC
 N G T V C R I Q A N N E V I L S A G S L R S P G I L E L S G V G N P S I L N K Y
 961 AACATTCGGTCAAAGTCAACCTGCCAAGTGGAGAGAACATGCAAGACCATGTACAATGACGCGCGGAGGATATCGGCCATCGCCGTTACCAAGTCTGTCGCTATCCA
 N I P V K V N L P T V G E N M Q D Q M Y N D A S A E G Y S A I A G T K S V A Y P
 1081 TGTGTACGAGCCTTTGGCAACGCGCAGCGCTGTCCGCGGCTCTGTTCAAGACCACTGGCCAGTACGCGGAGCAGCGGCGCAACGAGCGGAGCCATGAAGCGTCCGAC
 S V T D L F G N R T S A V A A S V Q N Q L A Q Y A E A A N Q S Q G T M K A S D
 1201 CTGAGCGGCTGTTCCAGATCCAATATGACCTGATCTTCAAGCAAGAGGTTCCGATTGCGGAGATCATCACTATCCACCGGGAACACCCCTGGCGCGGTTACTGGGTTCTCTCCG
 L Q R L F Q I Q Y D L I F K Q E V P I A E I I T Y P T G N T L A A G Y W G L L P
 1321 TTTGCTCGGGAGCGTGCATCGCGGACCCAGCGGTCCAGCGGTAAATAATCCCAATTTTCATGTTGCACTGGGATGTGCAGCAGAGATGGGACGCGCAAGTTTATC
 F A R G S V H I A S A D P T V Q P V I N P N Y F M F D W D V Q Q I G T A K F I
 1441 CGGAACCTGTACAGACGGCGCGTTGACGAGTCTGTCAAAACGAACGAGCGGAGCCAGCAGTGTGCTGCTGAGGAGGATCGGATAGTGTGGAGCGGTGGTGAAGGAGACATAT
 R N L Y K T A P L S S L V K N E T E P G S A V P E G A S D S V W E A W L K E T Y
 1561 CCGTCGAATTCATCCGTCGGACCGCGGCGATAATGCCCGGCTCTATCGAGGGGTGTTGACGAACGACTCGCGGTGTACGGCAAGGCAATGTCCGCTGGTGGATGCTCGGTG
 R S N F H P V G T A A I M P R S I G G V V D E R L R V Y G T A N V R V V D A S V
 1681 CTTCATTCCAGATTTGCGGCCATCTGACCGACGCGCTGTATGAGTTGCAGACGGGCGATCCGATTTCTGAGGAGGATGCGCGCGGATTTGGGCAATTGA
 L P F Q I C G G H L T S T L Y A V A E R A S D F L K E D A A R L G N *
 1782

[図7]

FIG.7

シグナル配列		FAD結合モチーフ	
Talaromyces emersonii	1	MLRRTVGLAVLSAALPCLQTA-SSSYDYIVVGGGTSGLVAVNRLSENPNSVLLVEAGDSVNNANVTNVNGYGLAFGTPIDWQYSGTNOYAGNTRQTLRAGKALGGTSTINGMAY	119
Thermoascus crustaceus	1	MLL-PLSLSLCSVAAT-----SYDYIVVGGGTSGLVAVNRLSENPNSVLLVEAGDSVNNANVTNVNGYGLAFGTPIDWQYSGTNOYAGNTRQTLRAGKALGGTSTINGMAY	110
Aspergillus oryzae	1	MLF-SLAFSLASLAPAGRAKNTTYYDYIVVGGGTSGLVAVNRLSENPNSVLLVEAGDSVNNANVTNVNGYGLAFGTPIDWQYSGTNOYAGNTRQTLRAGKALGGTSTINGMAY	119
Aspergillus terreus	1	MLG-KLSLALSAVAAPLSNST-SAKDYIVVGGGTSGLVAVNRLSENPNSVLLVEAGDSVNNANVTNVNGYGLAFGTPIDWQYSGTNOYAGNTRQTLRAGKALGGTSTINGMAY	118
	**	* * * * *	*****
Talaromyces emersonii	120	TRAQDVQIDAWAAGNDGHWSSLPYLYLKSEAFAPNQTORAAGASYNPAHYGTGTPHVGFI-EKQPNLSSILNQTYQALGVPTEDVNGKMGYNFFPSTVDDAADVREDAARAY	238
Thermoascus crustaceus	111	TRAEDVQIDAWAAGNDGHWSSLPYLYLKSEAFAPNQTORAAGASYNPAHYGTGTPHVGFI-EKQPNLSSILNQTYQALGVPTEDVNGKMGYNFFPSTVDDAADVREDAARAY	230
Aspergillus oryzae	120	TRAEDVQIDWQKLGNEGWTWKDLPYLYLKSEAFAPNQTORAAGASYNPAHYGTGTPHVGFI-EKQPNLSSILNQTYQALGVPTEDVNGKMGYNFFPSTVDDAADVREDAARAY	239
Aspergillus terreus	119	TRAEDVQIDAWETIGNTGWTWKDLPYLYLKSEAFAPNQTORAAGASYNPAHYGTGTPHVGFI-EKQPNLSSILNQTYQALGVPTEDVNGKMGYNFFPSTVDDAADVREDAARAY	237
	***	*****	*****
Talaromyces emersonii	239	YYPFES-RPNLRVMLNTLANRIVWKNETSGGNVTADGVEVTPUNGTVCRIOANNEVILSAGSLRSPGIIELSGVGNPSILNKYNIPVKVNLPTVGENMDQVNDASAEGYSALAG-TKS	356
Thermoascus crustaceus	231	YYPFESSRPNLSVMLNTYGNRIWANAINTNSVATGVEVTLSDGTQVTOIQANKEVILSAGSLSPAILERSGVGNPTVLSRFGIPLVNLTTVGENLQDQWTEFTYLSNATFSGGSTF	350
Aspergillus oryzae	240	YFPYDD-RKNLHLENTTANRLFWK-NGSAEEAIDAGVEITSADGKTVRVHAKKEVILSAGALRSPILIELSGVGNPTILKKNITPRVDLPTVGENLQDQWNGMAGEGYGLAG-AST	356
Aspergillus terreus	238	YMPYKS-RPNLHVLLNTFANRIVWIDGARDGDI TASGVEITSRNGTVRVINAEKEVIVSAGALKSPAILELSGIGNPSVLDKYNIPVKVNLPTVGENLQDQVNSHMDASGNTSISG-TKA	355
	**	* * * * *	*****
Talaromyces emersonii	357	VAYPSVTDLFENRTSVAASVQNLQAYEAAAQSGTAKASDLQRLFOIQYDLIFKQEVPIAEIITYP-TGNTLAAGYWGILLPFARGSVHIASADPTVQPVINPNYFMFDMDVQGGIG	473
Thermoascus crustaceus	350	LGHPTAADLFENRTSVAASVQNLQAYEAAAQSGTAKASDLQRLFOIQYDLIFKQEVPIAEIITYP-TGNTLAAGYWGILLPFARGSVHIASADPTVQPVINPNYFMFDMDVQGGIG	467
Aspergillus oryzae	357	VTYPSISDVFNETDSIVASLSRQSDYAAATVYKSNHMKQEDLERLYQLQFDLIVKQVPVIAELFHPGGGNAVSSEFWGLPFARGNTHISSNDPTAPAAINPNYFMFDMDVQGGIG	474
Aspergillus terreus	356	VSYPDVDFDEAEASVAKQIRASLKQYAADTAQANGNIKKAADLERLFEVQYDLIFKQVPVIAELVNPQGSATSVFAEFWALLPFARGSVHIGSSNPVEFPVINPNYFMFDMDVQGGIG	473
	* * *	* * *	*****
Talaromyces emersonii	474	TAKFIRMLYKTAPLSLVKNETEPG-SAVPEGASDSVMEAWLKET-YRSMFHPVGTAAIMPERSIGGVVDERLRYGTANVRVWDASVLPFQICGHLTSTLYAVAEASDLKEDAAALGN	593
Thermoascus crustaceus	468	SGKFRKLYGTAPFTNWTGATPGYSTLPANATDQWAGWISV-SRSMFHPVGTAAIMPERSIGGVVDERLRYGTANVRVWDASVLPFQICGHLTSTLYAVAEASDLKEDAAALGN	584
Aspergillus oryzae	475	IAKYIRKILRSAPLNKILAKEKPGLSLIPATADEKWEMLKAN-YRSMFHPVGTAAIMPERSIGGVVDERLRYGTANVRVWDASVLPFQICGHLTSTLYAVAEASDLKEDAKSA	593
Aspergillus terreus	474	VAKYIRRSFESYPLS-SIVKESLTPGYDVIPRNASEQSKWEVFDKNVRSNFPVGTAAIMPERSIGGVVDERLRYGTANVRVWDASVLPFQICGHLTSTLYAVAEASDLKEDAGPR	592
	* * *	* * *	*****

*: 相同なアミノ酸残基

FADGDH		相同性 (%)	
Aspergillus oryzae	Talaromyces emersonii	Thermoascus crustaceus	
	42	55	
	40	56	

FIG. 8

1	CTCAGCAATTTAATTTATGCTTCGACGGTGCATGCAGTGGGCTACAACATGGTTGGACCATCTACTTGCATGAAACGATCAATGACGATGAGATGCAGAAAAGACACGAGTACCCA	120
121	CCGAGCATCGGATGGACCAAGTCCAGCCCAATGAAAATCAAGATGGACGGCTTCGAAGTGACTTCGAAGCTGGGATATGCGATTTTATGTTTTCCTTACTGACTCTCTIGAA	240
241	AAGGAAACGGTTCACTCGTCAGACACCTGATTACGACCTTTCTATCTTGGGACCGTTGGAAAAATGTTCCAGAAAGCTGAACCCGATGGTCTTGTCCCGGCCCGCAAGAATCTACGGA	360
361	GAGATGTGGATAAGTCCCTGCTCGACAGTGTATAAAGCCAGGGATCCCAGGGTAAACAATCCACTCTTTTCCAGTCACTCCTTGGGTCTTCGACCAGGAAATCACAGCAATGTTCGTC	480
481	CCCCCTTCCCTCGCTCCCTCTGCTCCGTGGCGCGCGGCAACCTCCTATAGACTACATTAATCGTCGGAGGAGCACCTCGGGTTTGGTCGTGGCCCAACCCGCTGTCCGAGGACCTCGTCGGTC	600
601	TCGTCTGGTTGTTCGAGGCTGGTGACTCGGTCTACAAACAACCCAAATGTACCGGCAACCGGTGGCTACGGTTCGGGCTTCGGGACCTCCATCGACTGGGGTACCGAGACCATCAAAACAG	720
721	CCCTACGCGCGGAGACCTCACCCAGACCAACCGTGTGGAAGGGCTTGGAGGCCACAGCACCATCAACGGTATGTAGCCCTCCCCAGTAAATCATGATGAGTGTGACTGATGAAGCCAG	840
841	GCATGGCCTATACCCGTTCGGGAGGAGCTCCAGATCGATGCGCTGGAGGGCCATTTGGCAACCCAGGGCTGGAACTGGTCGACTCTATTCCTTACTACCTGAAGAGTGGGGTTCGAGATAC	960
961	CCATCAAGCCCGAGCTGCTGCCGGTGGCACTGGAAACCCGGGCTAGCCACGGGATGAACGGGCCGTTAGGACCTGGCTAGCAGATGATGAACGGCAGCATGGCCGGAAGTCCCTCA	1080
1081	ACGCCACTTACGAGAACCTTGGGTATTTCTTACCTCCCGATGTCAACCGGGGCAAGATGCACGGGTACAGCCCTCTCCCGGAACCGGTCAACCGGGGCCCTGACGCTGGGTGAGGATGGCG	1200
1201	CCAGGGGCTACTACTACCGTTCCGAATCCTCCAGGGCCAAATCTCTGGTCACTGCTCAACACCTATGGCAACCGCATAGTCTGGGCTAAGCCCCAACACACCACTCTGTGACTGCTACTG	1320
1321	GTGTGGAGGTCACTCTCAGGACCGTACCGTTCAAACATCCAGGGCAACAAGGAGGTCACTGCTCTGCGGGTTCTGTGATTTTACCAGCGGATCTTCGGAGGCTCTGGTGTTGGTAAACC	1440
1441	CAACGTAAGTAAAAAGAGGAGACTGATCCTTAGCCCTGGTCTTGACATCGCTGGCAGTGTCTCAGCCGCTTGGGCAATCCCCCTTGTGTGTTAACCTGACCAACCGTGGGTGGGTAATACTC	1560
1561	TCCAGACCCAGATGAACACGAGTTTCACTACCTGAGCAACGGTACTTTTACGGGGCCAGTCAACCTTCCTCGGCCACCCGACCGCGCGCGGCACTCTTTGGCAGCAACGCTGACAAACGTGG	1680
1681	CCAACTCCGTTTCAGAGCAGCTGCCTCACTATGCCGGCACCGTGTCCGAGGCCAGCAACGGTACCAAGAGGCTGCTGTCTCCAGAAATGTTCGAACCTGAGTACAACTATCATCTTCA	1800
1801	ACAACCGACCCCATTCGGCGAGATCTTGGTGGCCCTTCTGGCTCCAAATTCATCACTGAGTACTGGGCCCTGCTCCCTTTCCTGTGGAAAGCTCCACATGGCTCTGCCAACCCCTC	1920
1921	TGGATCGACCTGTCAACAACCCCACTACATGATGTTCCAGTGGGACATGCAAGGAGCAGATTGGCTCGGGCAAGTTTGTCCGCAAGCTCTACGGGACAGCTCGGTTCAACCAATTTGGGCTA	2040
2041	CGGGGAGGGTACTCCCGGGTACTCCACCTTCCTTCGCAACGCCACCGATGGCCAGTGGGCTCAGTGGATCAGGCTGTGCTGAGTAACCCCTTTCATCTCCTTGGAAATTAAGATGCA	2160
2161	TTTTGCTGATGACTGCAACTACCACTCGTTTCCAACTTCCACCCGTCGGTACCCGCGCCAIGATGCCAGGGACATGGGTGGTGTGTGCGACAGCAACCTGTGGTCTACGGCACCAAC	2280
2281	AACGTGCGTGTGATTGATGCGCTCTGCTTCCCTTGGCAAGTCTGTGGCCACTTGGTTAGTACCTCTACGGCTTGCAGAGCGGCGCTCGGACCTCATCAAGCCGGTCAGGCTTAAGGG	2400
2401	GTGTGGCCCCAGGTTCTGTGTTCGGGCACCTGCGGTTGGGTCATGTTCCCTCCAAACCGCACCCGCCCAAGAACTCGATTGGCAAACTTTTGAATTTAGATTGGCCTTTTTTC	2520
2521	CCATGTGTTATTTGACCAAAATCTTCCTCCGACAACACTCACTCTGAACCGTCCAGGTCACAGCGGGAAATGGAGATCT	2596

[図9]

FIG.9

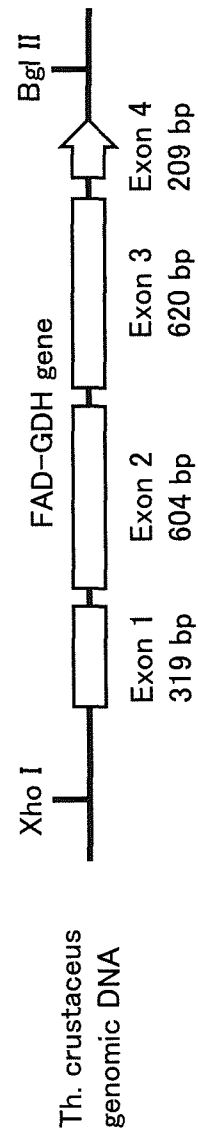


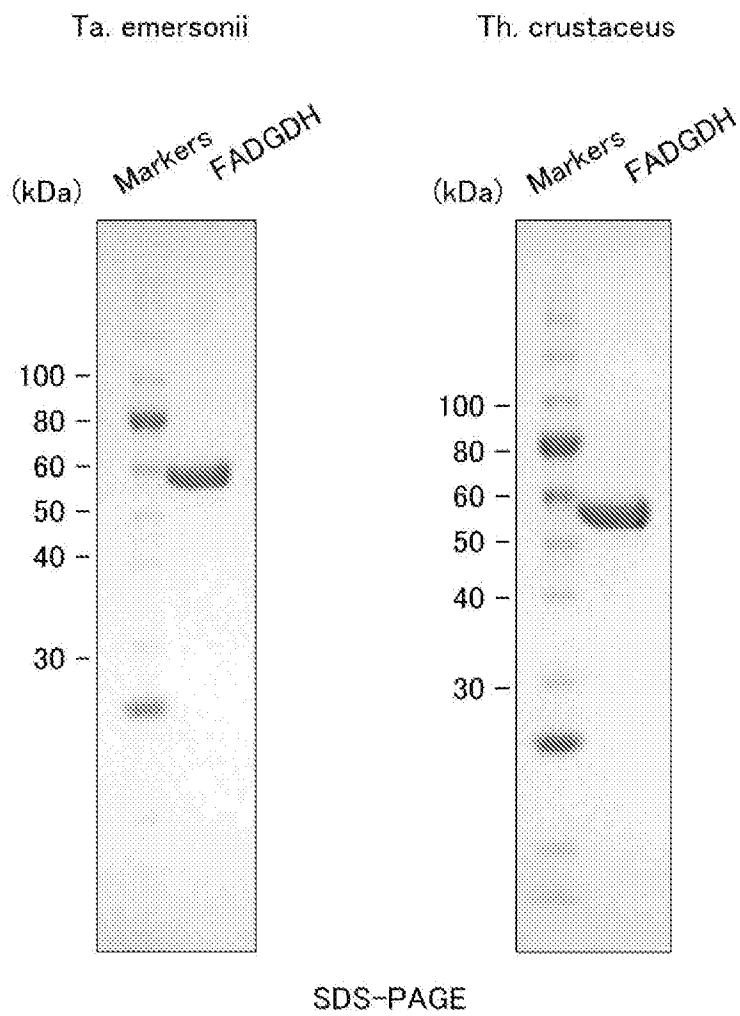
FIG. 10

FAD結合モチーフ

1	A T G T G T C C C C C T T C C C T C T C C C T G C T G C T G C G T G G C G C G G C C A C C T C C T A T A G C T A C A T T A T C G T C G S A G A G G C A C C T C G G G T T G G T C G T G G C C A A C C C G C T G T C G A G G A C M L L P L S L L S L C S V A A A J T S Y D Y I I V G G G T S G L V V A N R L S E D
121	T C G T C G G T C T C T G T T G T C G A G G C T G T G A C T C G G T C T A C A C A C C C A A T G T C A C G G C A C G G T G C C T A C G G T T C G G C C T C C G A C C T C C A T C G A C T G G G G T A C C A G A C C S S V S V L V V E A G D S V Y N N P N V T G T G A Y G A F G T S I D W A Y Q T
241	A T C A A C A G C C C T A C G C G G A G A C C T C A C C C A G A C C A T C G G T G C T G G A A G G C C C T T G G A G G C A C C A G A C C A T C A A C G G C A T G G C C T A T A C C C G T G C G G A G G A G C T C C A G A T C G A T G C C I K Q P Y A G D L T Q T I R A G K A L G G T S T I N G M A Y T R A E D V Q I D A
361	T G G A G G C O A T T G G C A A C C A G G C T G S A A C T G G T C G A C T A T T C C C T T A C T A C T G A G A G T G A G C G G T T C C A G A T A C C C A T C A A G C C C A G T C T G C T G C C G T G C C A A C T G G A A C C C G G W E A I G N Q G W N W S T L F P Y Y L K S E R F Q I P I N A Q S A A G A N W N P
481	G C G T A C C A G G G A T G A A C G G C C C G T T G A C A C T G G C T G G A C C T A C A G A T G A T G A A C G G A G C A T G G C G A G T C C T A C A G C C A C T T A C C A G A A C T G G G T A T T C T T A C C T C C C C G A T A Y H G M N G P L T T G W T Y E M M N G S M A E V L N A T Y Q N L G I S Y L P D
601	G T C A A C G G G G C A A G A T G A C G G G T A C A C C C T T C C C C G A A C C G T C A A C C G G C C T C G A C G T G C G T G A G A T G C G C C A G G G C T A C T A C C G T T C G A A T C C T C A G G G C C A A T V N G G K M H G Y T L F P R T V N R A L D V R E D A R A Y Y Y P F E S S R P N
721	C T C T C G G T A T G C T C A A C A C C T A T G G C A A C C G A T A G T C T G G G C T A A C G C C A C C A C C A C C A C T C T G T G A C T G C T A C T G T G G A G G T C A C T C T A G C G A C G G T A C C G T T C A A A C A A T C L S V M L N T Y G N R I V W A N A T N T N S V T A T G V E V T L S D G T V Q T I
841	C A G G C A A A A G G A G G T A C T C T C T G C C G G T T C T C T G A T T T C A C A G C G A T T C G G A G C G C T G G T T G G T A C C C A C T G T C C T A G C C G C T T C G G C A T T C C C C T G T G T T A A C Q A N K E V I L S A G S L I S P A I L E R S G V G N P T V L S R F G I P L V V N
961	C T G A C C A C C G T G G G T G A A A T C T C A G A G C C A G A T G A A C C G A G T T C A T C T A C T G A G A A C G C T A G T T C A G C G G C A G T A A C C T C C T C G G C A C C G A C C G C G G C A C C T C T T T L T T V G E N L Q D Q M N T E F I Y L S N A T F S G Q S T F L G H P T A A D L F
1081	G G C A G C A A C G T G A C A A A C G T G G C A A G T C C G T T C A G A G C A G C T G G C T A C T A T G C C C C A C C G T G T C G A G G C A G G A C G G T A C C A T A G C G C T G C T T C C A G A A A T T G T T C C A A G S N V T N V A K S V Q S S L P H Y A A T V S E A S N G T M S A A V L Q K L F Q
1201	C T G A G T A C A A C A T C A T C T T C A A A C C G A C C C C A T C G C G G A G A T C T T G G T C G C C C C T T C T G G C T C C A A T T A C T A G T A G T A G T G G G C C C T G C T T C C T T G C T G T G G A A A C G T C L Q Y N I I F N N P T P I A E I L V A P S G S K F I T E Y W A L L P F A R G N V
1321	C A C A T T G C T C T G C A A C C T C T G G A T C G A C T G T C A T C A C C C C A A C T A C A T G A T G T T C G A G T G G G A C A T G A G G A C A G A T T G C C T C G G G A A G T T G T C C G C A A G C T C T A C G G G A C A H I G S A N P L D R P V I N P N Y M F E W D M Q E Q I A S G K F V R K L Y G T
1441	G C T C C G T T C A C C A A T T G G G C T A C G G G A G G C T A C T C C C G G T A C T C A C C C T C C C T G C C A A C G C C A C C G A T G G C A G T G G G C A G T C A G T C T G C T C T G C T C C A A C T T C C A C A P F T N W A T G E A T P G Y S T L P A N A T D G Q W A Q W I S S V S R S N F H
1561	C C C G T C G G T A C C G C G C C A T G A T G C C C A G G G A C A T G G G T G G T T G T G C A G A G C A C C T C G T G G T C T A C G G C A C C A A C A C G T G C G T G A T T G A T G C C T T G C C T T C C C T G C A A G T C P V G T A A M P R D M G G V V D S N L V V Y G T N N V R V I D A S V L P L Q V
1681	T G T G C C A C T T G G T A G T A C C C T C T A C G C G T T G C A G A G G C G C C T C C G A C C T C A T C A A G C C G G T C A G G T C T A A C G H L V S T L Y A V A E R A S D L I K A G Q V *
1755	

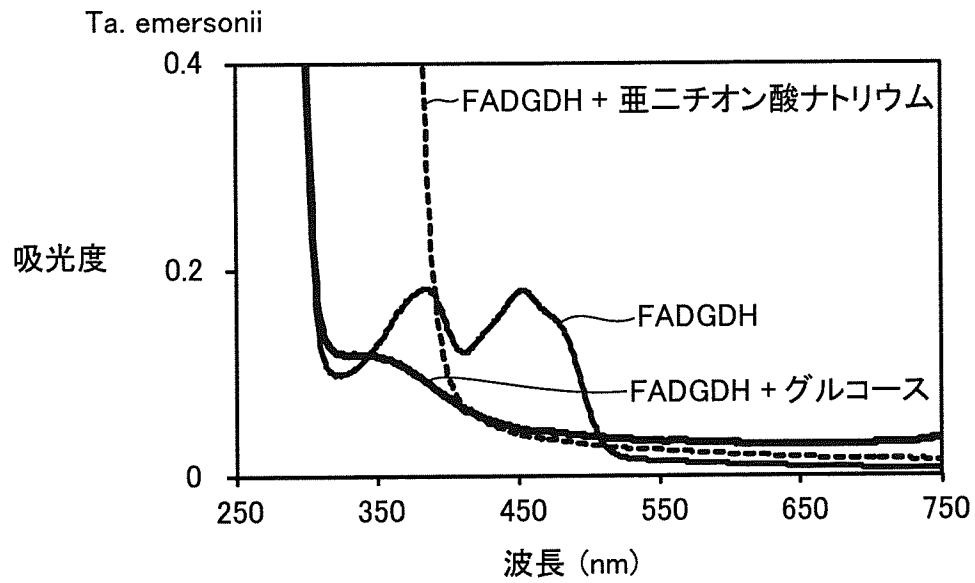
[図11]

FIG.11



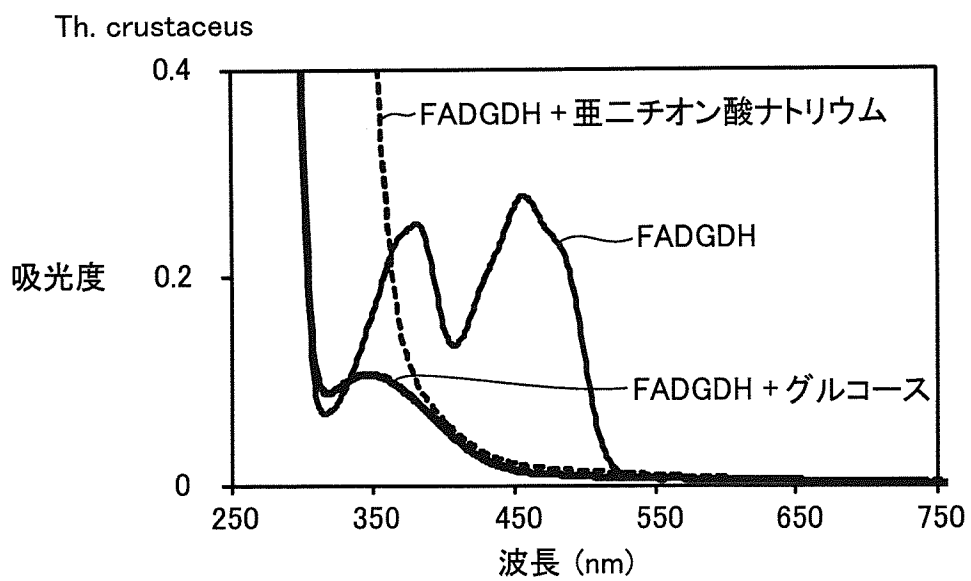
[図12]

FIG.12



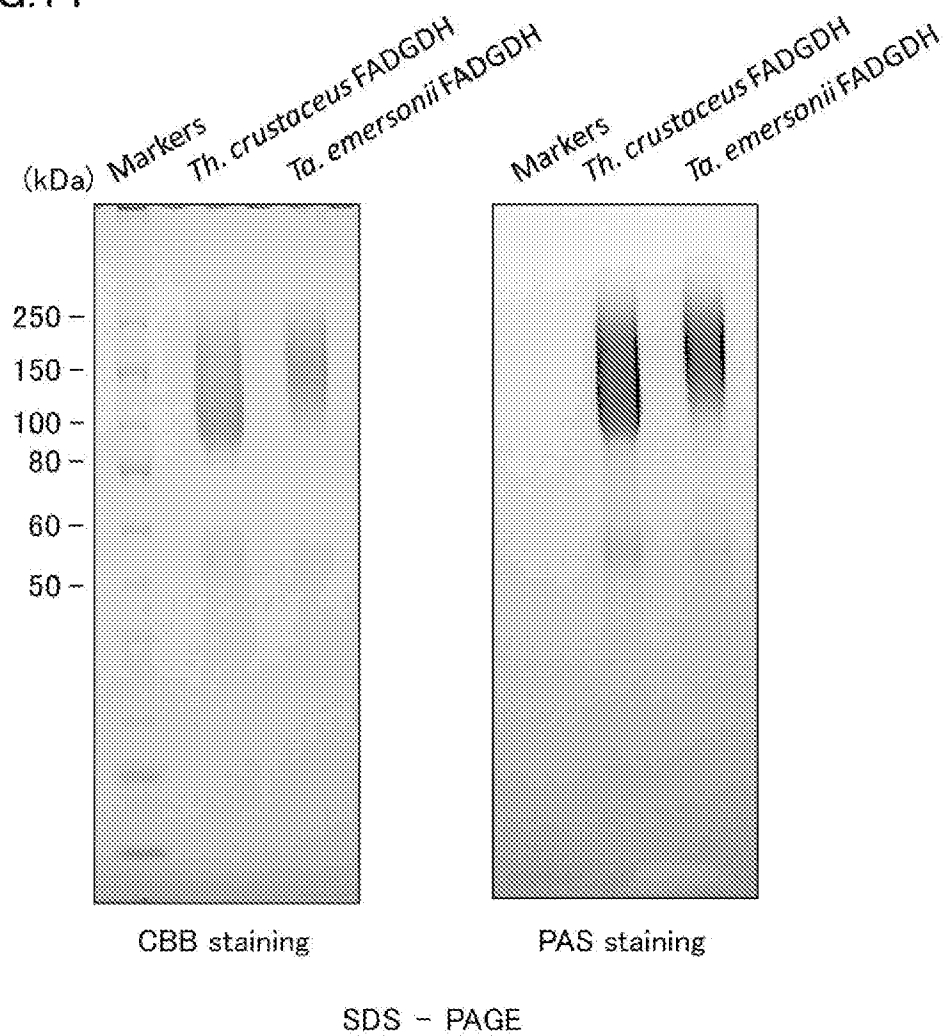
[図13]

FIG.13



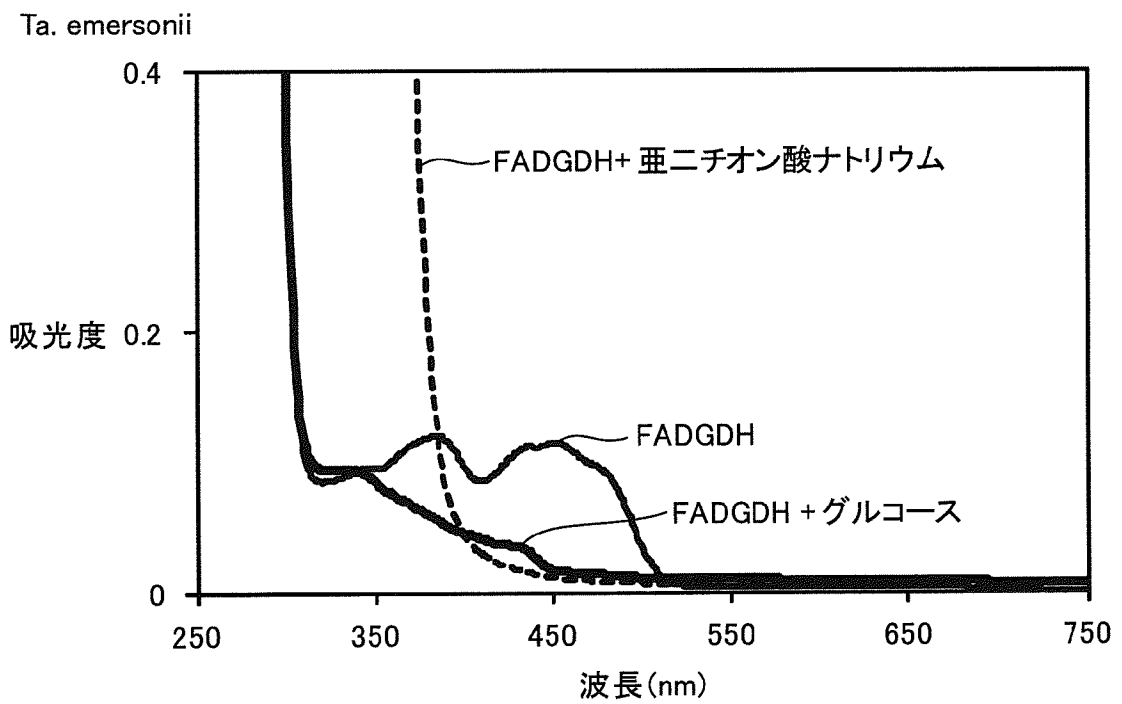
[図14]

FIG.14



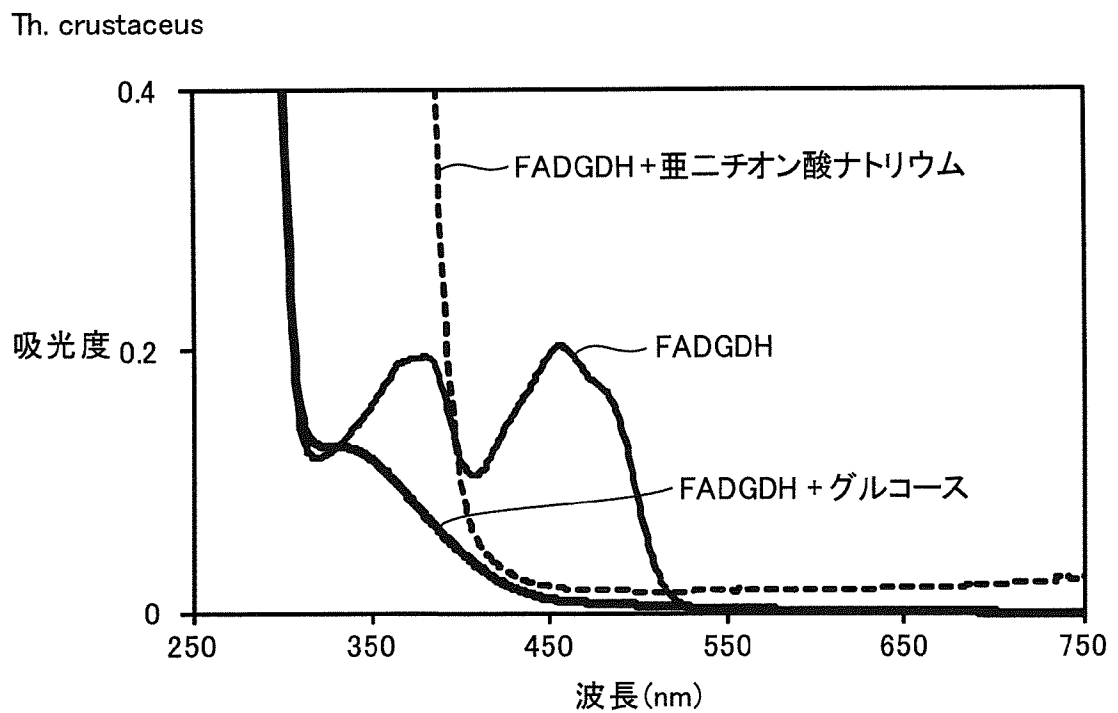
[図15]

FIG.15



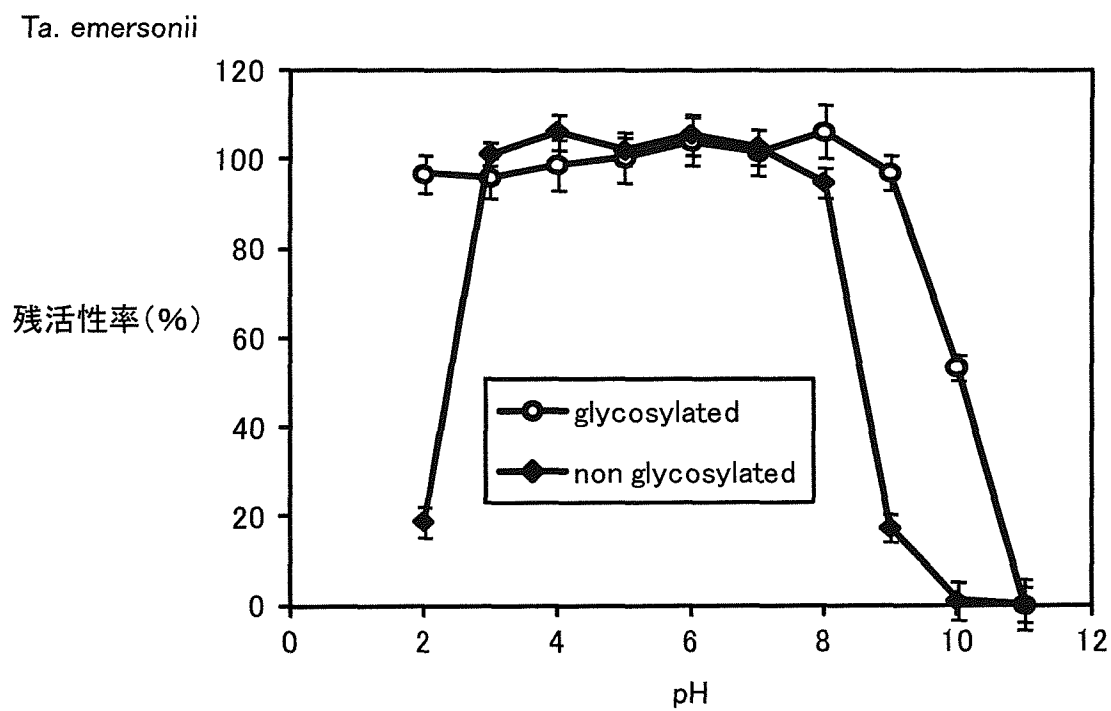
[図16]

FIG.16



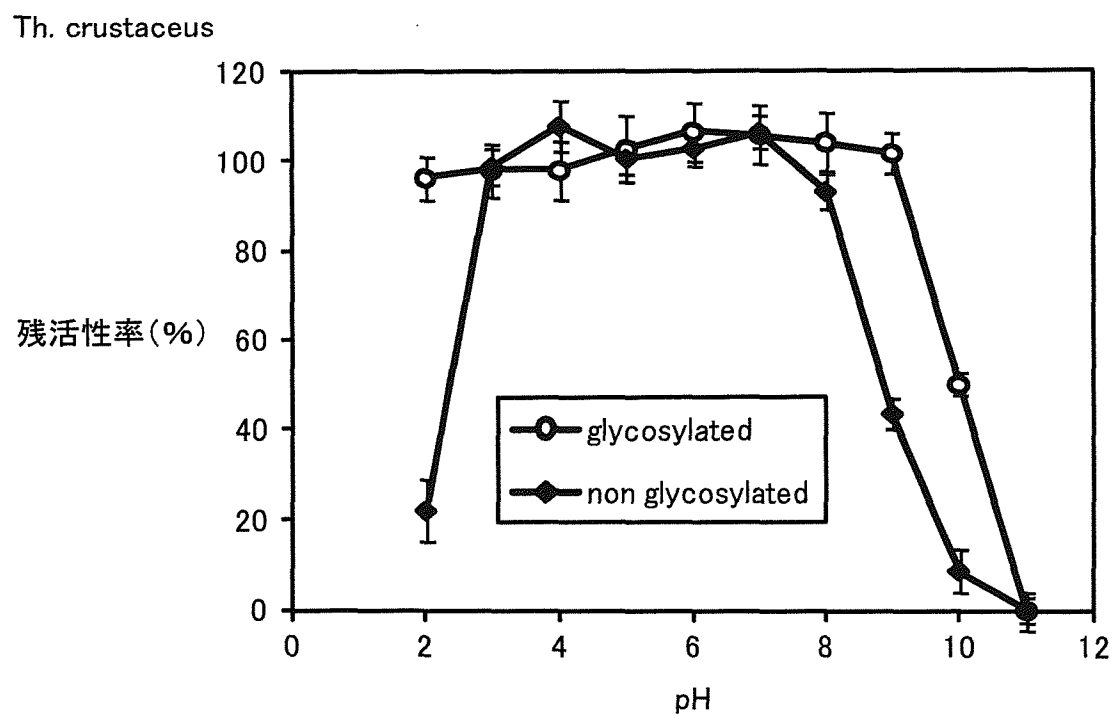
[図17]

FIG.17



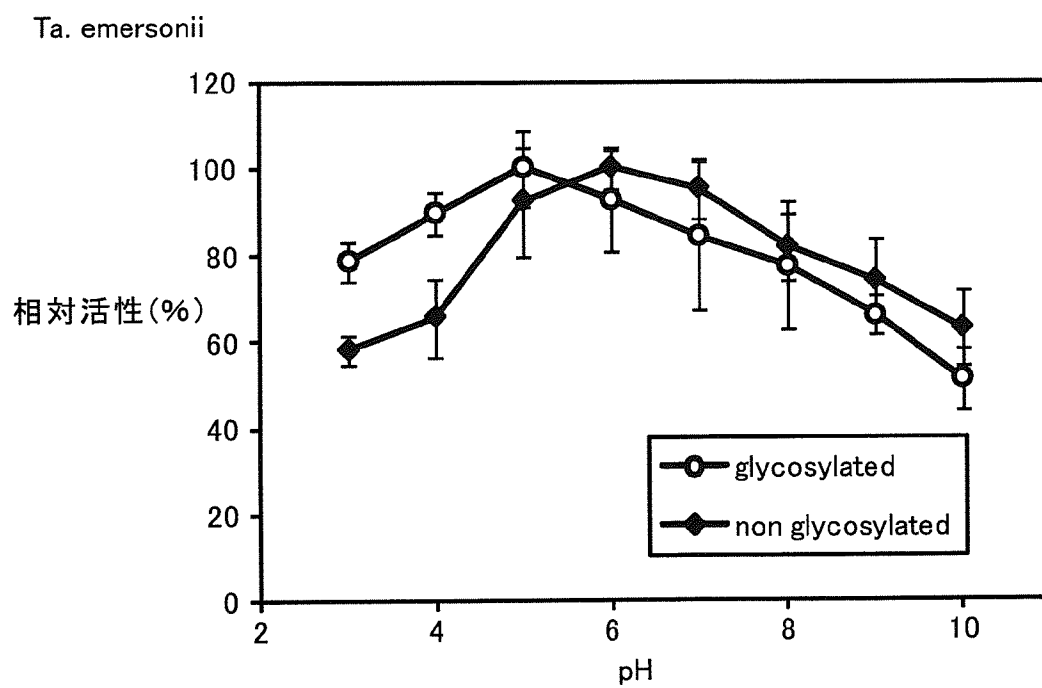
[図18]

FIG.18



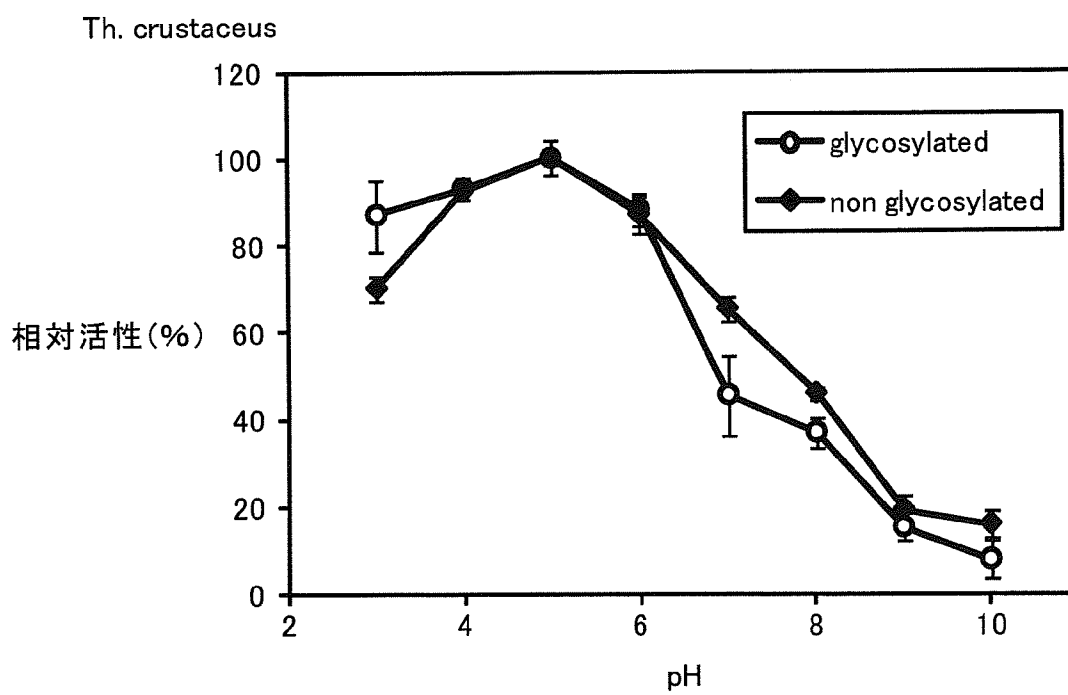
[図19]

FIG.19



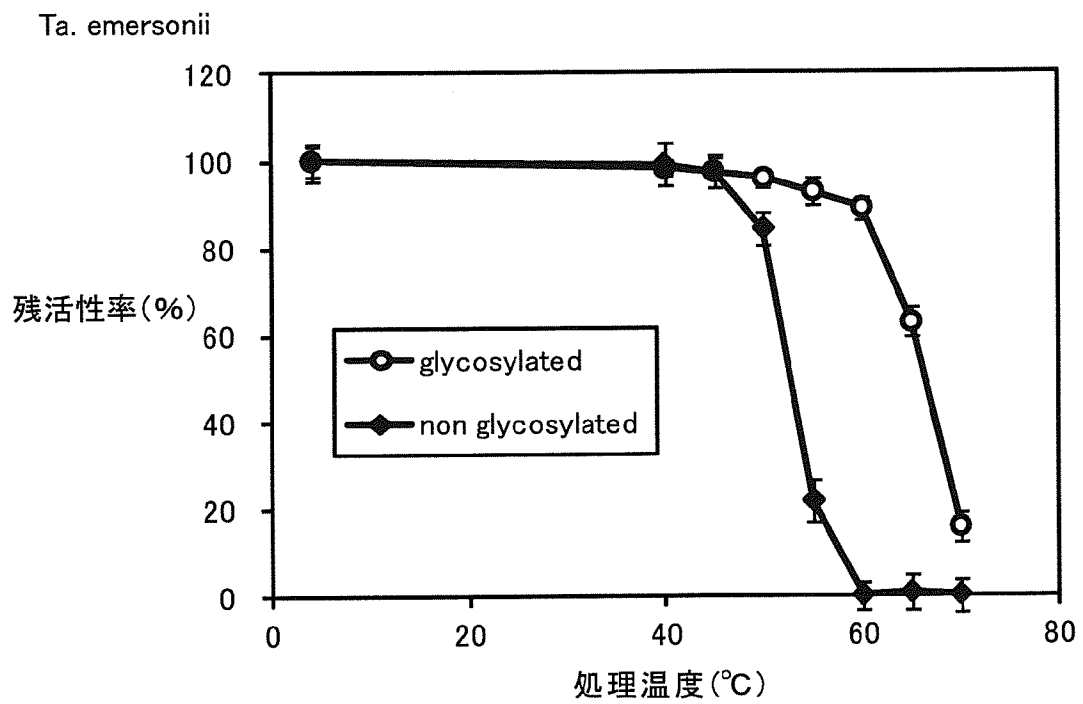
[図20]

FIG.20



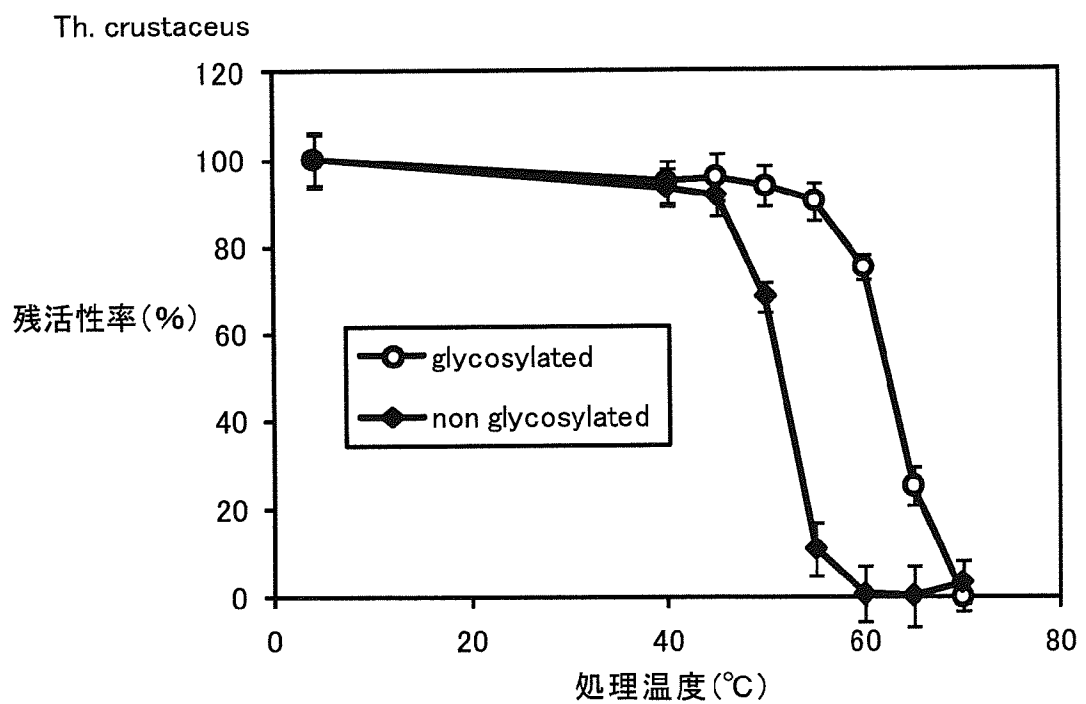
[図21]

FIG.21



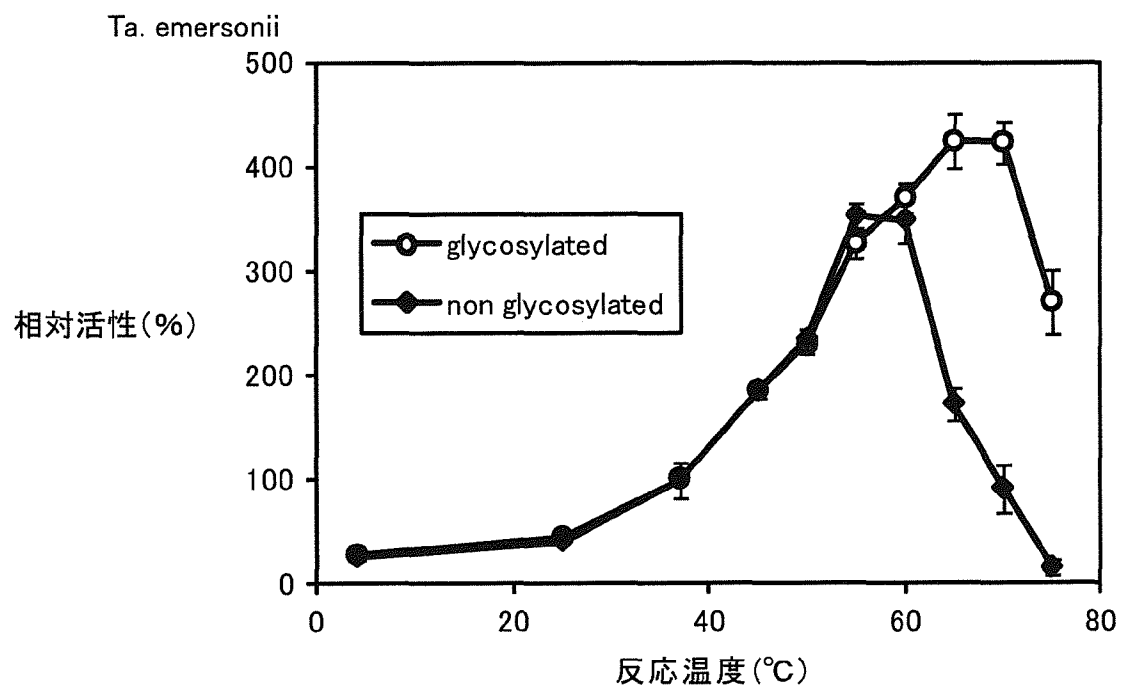
[図22]

FIG.22



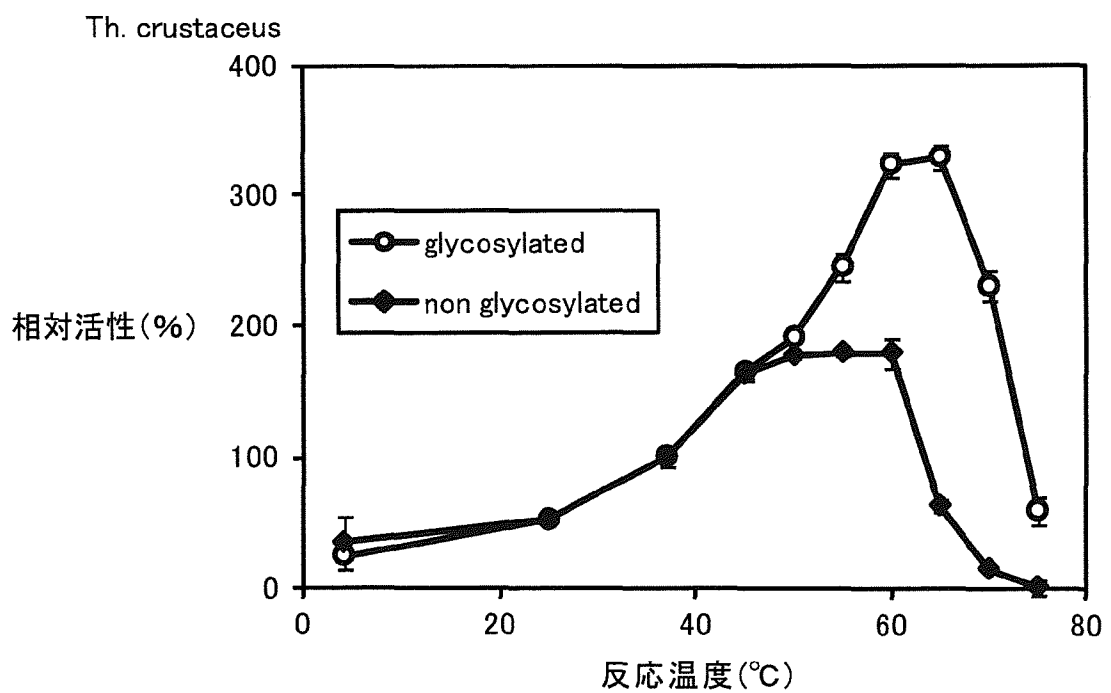
[図23]

FIG.23



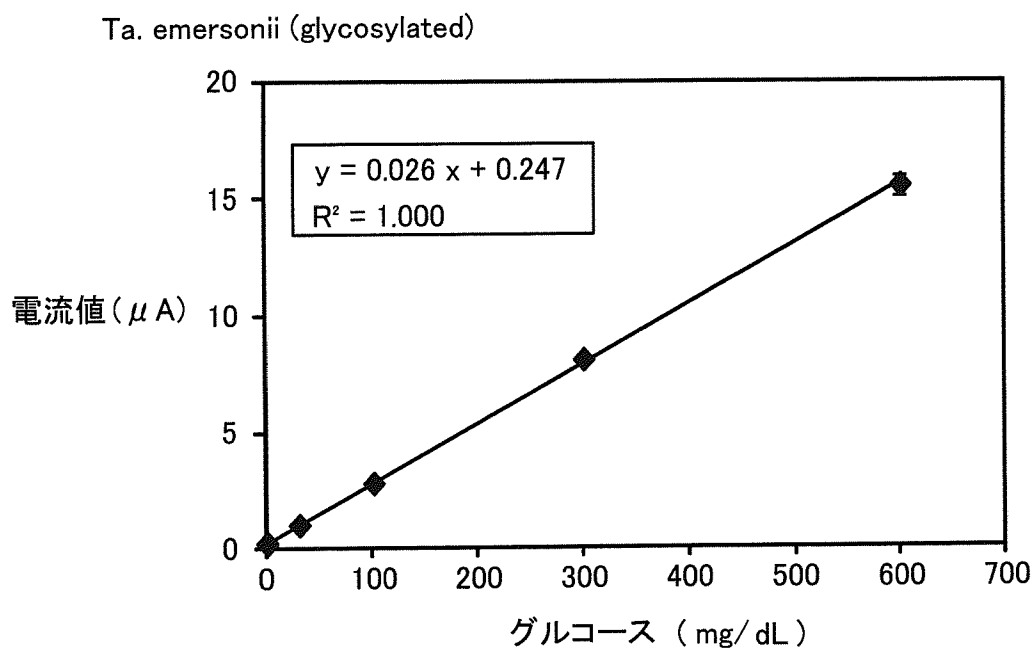
[図24]

FIG.24



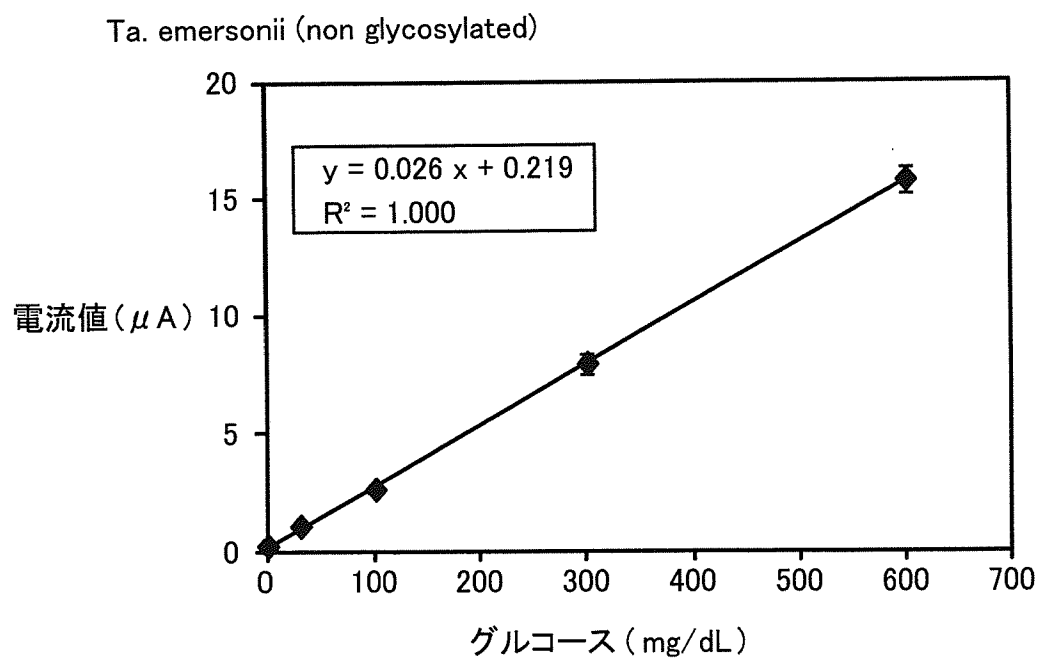
[図25]

FIG.25



[図26]

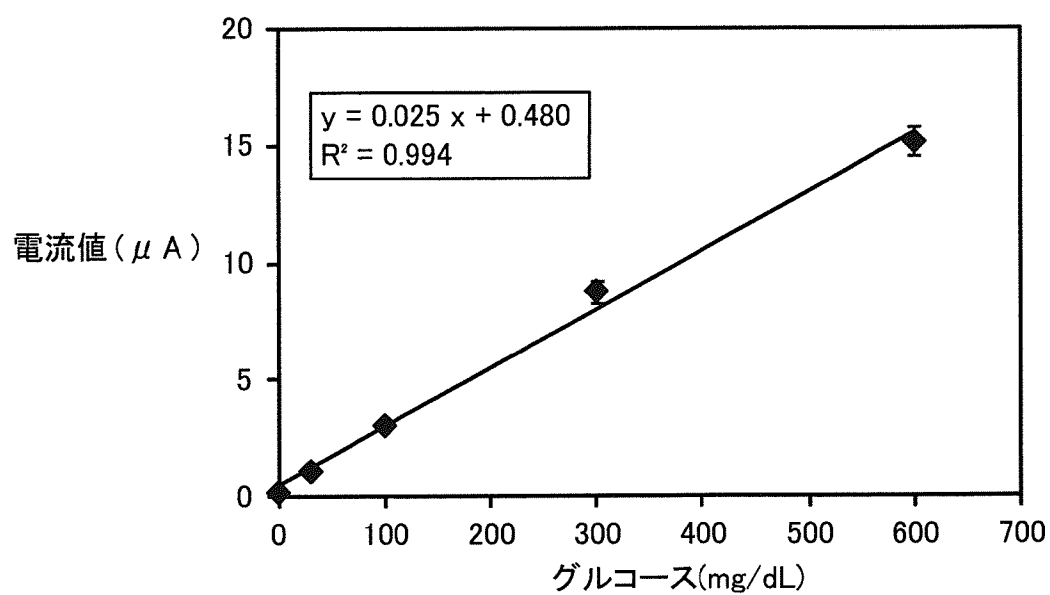
FIG.26



[図27]

FIG.27

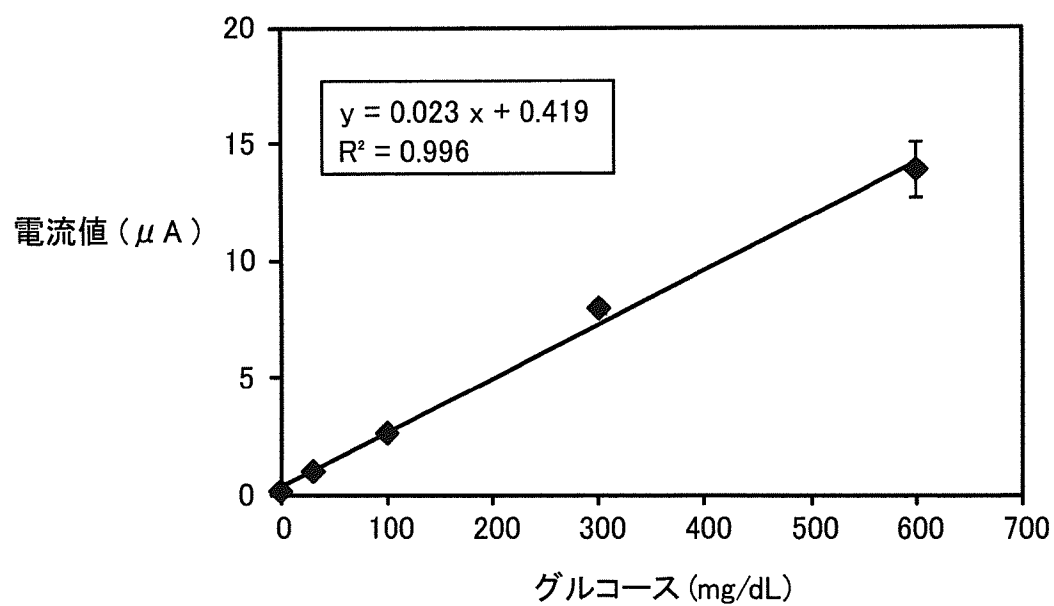
Th. crustaceus (glycosylated)



[図28]

FIG.28

Th. crustaceus (non glycosylated)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/074199

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(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, C12N9/04(2006.01)i, C12Q1/32(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)

C12N15/09, C12M1/34, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/04, C12Q1/32, H01M4/90, H01M8/16

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 1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2013 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2013

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
UniProt/GeneSeq, SwissProt/GeneSeq, PubMed, WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2011-139677 A (Unitika Ltd.), 21 July 2011 (21.07.2011), entire text (Family: none)	1-16
A	JP 2010-57427 A (Toyobo Co., Ltd.), 18 March 2010 (18.03.2010), claims (Family: none)	1-16
A	WO 2012/073987 A1 (Kikkoman Corp.), 07 June 2012 (07.06.2012), claims (Family: none)	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

07 October, 2013 (07.10.13)

Date of mailing of the international search report

15 October, 2013 (15.10.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/074199

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Mori K. et al., Screening of Aspergillus-derived FAD-glucosedehydrogenases from fungal genome database, Biotechnol Lett, 2011, Vol.33, p.2255-2263	1-16
P,X	Kazumichi OZAWA et al., "Screening of FAD-dependent glucose dehydrogenase gene from thermophilic fungi", Abstracts of the Annual Meeting of the Society for Biotechnology, Japan, 25 September 2012 (25.09.2012), vol.64, page 42	1-16
P,X	Kazumichi OZAWA et al., "Konetsusei Shijokin Yurai FAD Izongata Glucose Datsusuiso Koso no Idenshi Cloning", Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry Taikai Koen Yoshishu (web), 05 March 2013 (05.03.2013), vol. 2013, page web only 3C15A15	1-16

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N15/09(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, C12N9/04(2006.01)i, C12Q1/32(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（I P C））

Int.Cl. C12N15/09, C12M1/34, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/04, C12Q1/32, 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	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 3 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 3 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 3 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),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, SwissProt/GeneSeq,
PubMed, WPI

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2011-139677 A（ユニチカ株式会社）2011.07.21, 全文（ファミリーなし）	1 - 1 6
A	JP 2010-57427 A（東洋紡績株式会社）2010.03.18, 特許請求の範囲（ファミリーなし）	1 - 1 6
A	WO 2012/073987 A1（キッコーマン株式会社）2012.06.07, 特許請求の範囲（ファミリーなし）	1 - 1 6

☒ 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

0 7 . 1 0 . 2 0 1 3

国際調査報告の発送日

1 5 . 1 0 . 2 0 1 3

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）

北村 弘樹

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

4 N

9 3 4 9

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	Mori K. et al., Screening of Aspergillus-derived FAD-glucosedehydrogenases from fungal genome database, Biotechnol Lett, 2011, Vol.33, p.2255-2263	1-16
P, X	小澤一道他, 好熱性糸状菌からの FAD 依存型グルコース脱水素酵素遺伝子の探索, 日本生物工学会大会講演要旨集, 2012.09.25, Vol.64, p.42	1-16
P, X	小澤一道他, 好熱性糸状菌由来 FAD 依存型グルコース脱水素酵素の遺伝子クローニング, 日本農芸化学会大会講演要旨集 (web), 2013.03.05, Vol.2013, page web only 3C15A15	1-16