

(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 1 月 3 日(03.01.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/002973 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) *C12N 9/04* (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) *C12Q 1/32* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/067309
- (22) 国際出願日: 2013 年 6 月 25 日(25.06.2013)
- (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 2012-146803 2012 年 6 月 29 日(29.06.2012) JP
- (71) 出願人: 東洋紡株式会社 (TOYOBO CO., LTD.)
[JP/JP]; 〒5308230 大阪府大阪市北区堂島浜二丁目 2 番 8 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 角田 洋輔 (SUMIDA, Yosuke); 〒9148550 福井県敦賀市東洋町 1 〇 番 2 4 号 東洋紡株式会社内 Fukui (JP). 平尾 理恵 (HIRAO, Rie); 〒9148550 福井県敦賀市東洋町 1 〇 番 2 4 号 東洋紡株式会社内 Fukui (JP). 歌島 悠 (UTASHIMA, Yuu); 〒9148550 福井県敦賀市東洋町 1 〇 番 2 4 号 東洋紡株式会社内 Fukui (JP). 北澤 宏明 (KITAZAWA, Hiroaki); 〒9148550 福井県敦賀市東洋町 1 〇 番 2 4 号 東洋紡株式会社内 Fukui (JP). 相場 洋志 (AIBA, Hiroshi); 〒9148550 福井県敦賀市東洋町 1 〇 番 2 4 号 東洋紡株式会社内 Fukui (JP). 岸本 高英 (KISHIMOTO, Takahide); 〒9148550 福井県敦賀市東洋町 1 〇 番 2 4 号 東

洋紡株式会社内 Fukui (JP). 柳谷 周作 (YANAGIDANI, Shusaku); 〒9148550 福井県敦賀市東洋町 1 〇 番 2 4 号 東洋紡株式会社内 Fukui (JP).

- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, 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, 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))

(54) Title: NOVEL GLUCOSE DEHYDROGENASE

(54) 発明の名称: 新規なグルコース脱水素酵素

(57) Abstract: [Problem] To provide a new glucose dehydrogenase suitable for utilization in an SMBG sensor due to superior substrate specificity, specific activity, heat stability, and the like. [Solution] Flavin-binding glucose dehydrogenase comprising any polypeptide (a)-(c) below: (a) a polypeptide comprising an amino acid sequence shown by SEQ ID NO: 1; (b) a polypeptide having glucose dehydrogenase activity and comprising an amino acid sequence in which one or multiple amino acid residues in the amino acid sequence shown by SEQ ID NO: 1 have been substituted, deleted, inserted, added and/or inverted; and (c) a polypeptide having glucose dehydrogenase activity and comprising an amino acid sequence having 80% or greater identity with the amino acid sequence shown by SEQ ID NO: 1.

(57) 要約: 【課題】基質特異性、比活性、及び熱安定性等に優れることにより、SMBG 用センサーへの利用に適した新たなグルコース脱水素酵素を提供する 【解決手段】下記の (a) ~ (c) のいずれかのポリペプチドからなるフラビン結合型グルコース脱水素酵素: (a) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、(b) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加および/または逆位したアミノ酸配列からなり、かつ、グルコース脱水素酵素活性を有するポリペプチド、(c) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列との同一性が 80% 以上であるアミノ酸配列からなり、かつ、グルコース脱水素酵素活性を有するポリペプチド。



WO 2014/002973 A1

明 細 書

発明の名称：新規なグルコース脱水素酵素

技術分野

[0001] 本発明はグルコース脱水素酵素（以下、GDHとも表す。）に関する。詳しくは、本発明はフラビン結合型グルコース脱水素酵素（以下、FGDHとも表す。）、及び当該酵素の生産菌、当該酵素の製造方法、当該酵素を使用したグルコース測定方法などに関する。

背景技術

[0002] 血糖自己測定（SMBG：Self-Monitoring of Blood Glucose）は糖尿病患者が自己の血糖値を管理し、治療に活用するために重要である。近年、SMBGのために、電気化学的バイオセンサを用いた簡易型の自己血糖測定器が広く用いられている。バイオセンサは、絶縁性の基板上に電極、酵素反応層を形成したものである。

[0003] ここで用いられる酵素としては、グルコース脱水素酵素（GDH）、グルコースオキシダーゼ（GO）などが挙げられる。GO（EC 1. 1. 3. 4）を用いた方法は、測定サンプル中の溶存酸素の影響を受けやすく、溶存酸素が測定結果に影響を及ぼすといった問題点が指摘されている。一方でGDHは、溶存酸素の影響を受けないが、例えば、ピロロキノリンキノン依存型グルコース脱水素酵素（PQQ-GDH）（EC 1. 1. 5. 2（旧EC 1. 1. 99. 17））は、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正確な血糖値の測定には適していない。

[0004] 溶存酸素の影響を受けず、マルトースにもほとんど作用しないフラビン結合型グルコース脱水素酵素として、フラビンアデニンジヌクレオチド依存性グルコース脱水素酵素（以下、「FADGDH」とも表す。）が知られている。

例えば、特許文献1～5には、アスペルギルス・テレウスやアスペルギルス・オリゼ由来のもの、あるいは、それらを改変したものなどが報告されてい

る。

また、非特許文献1には、子のう菌であるグロメレラ・シンギュレタ (*Glomerella cingulata*) (無性世代名コレトリカム・グロエオスポロイデス (*Colletotricum gloeosporoides*)) 由来のものが報告されている。

しかし、これらの酵素は、キシロースに対する反応性が比較的高いため(特許文献1、非特許文献1)、キシロース負荷試験を受けている者の血糖を測定する場合には、正確性の点で改善の余地がある。

一方、キシロースに対する作用性が比較的低いフラビン結合型GDH(特許文献6)やGOとGDHの長所を併せ持つ改変型GDH(特許文献7)などが開発されているが依然として改善の余地がある。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1: WO2004/058958

特許文献2: WO2006/101239

特許文献3: 特開2007-289148

特許文献4: 特開2008-237210

特許文献5: WO2008/059777

特許文献6: WO2010/140431

特許文献7: WO2011/068050

非特許文献

[0006] 非特許文献1: *Microbiology* (2011) 157: 3203-3212

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 上記のような現状の下、本発明者等は、SMBGにおける使用により適した、新規なグルコース脱水素酵素を開発すべく日夜検討を重ね、優れた基質

特異性に加えて、比活性が高く、安定性に優れた酵素を利用することで、測定時間を短縮し、且つ、少量の酵素量で正確な血糖値の測定が可能になるという課題を見出した。すなわち本発明は、基質特異性、比活性、及び熱安定性等に優れることにより、SMBG用センサーへの利用に適した新たなグルコース脱水素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

[0008] 上記課題を解決するために、本発明者らは、日夜検討を重ね、多くの微生物についてスクリーニングした結果、これまでにグルコース脱水素酵素を生産することが報告されていない或る微生物がグルコース脱水素酵素活性を有することを見出した。そして、本発明者等は、当該酵素を単離精製し、その特性を調べた結果、フラビン結合型のグルコース脱水素酵素であり、特異性に優れ、高い比活性および優れた熱安定性を備えていることを見出した。

本発明は、係る知見に基づき、更なる研究と改良を重ねた結果完成したものであり、代表的な本発明は、以下の通りである。

[0009] 項1.

下記の（a）～（c）のいずれかのポリペプチドからなるフラビン結合型グルコース脱水素酵素；

（a）配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド

（b）配列番号1に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加および／または逆位したアミノ酸配列からなり、かつ、グルコース脱水素酵素活性を有するポリペプチド

（c）配列番号1に示されるアミノ酸配列との同一性が80%以上であるアミノ酸配列からなり、かつ、グルコース脱水素酵素活性を有するポリペプチド

項2.

以下の（A）～（F）のいずれかのDNA：

（A）配列番号1に示されるアミノ酸配列をコードするDNA、

（B）配列番号2に示される塩基配列からなるDNA、

(C) 配列番号 2 に示される塩基配列との同一性が 80%以上である塩基配列からなり、かつ、グルコース脱水素酵素活性を有するポリペプチドをコードする DNA ;

(D) 配列番号 2 に示される塩基配列に相補的な塩基配列に対してストリンジントな条件下でハイブリダイズする DNA であり、かつ、グルコース脱水素酵素活性を有するポリペプチドをコードする DNA、

(E) 配列番号 2 に示される塩基配列において、一若しくは数個の塩基が置換、欠失、挿入、付加及び／又は逆位されている塩基配列であり、かつ、グルコース脱水素酵素活性を有するポリペプチドをコードする DNA、

(F) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、付加、又は逆位したアミノ酸配列からなり、かつ、グルコース脱水素酵素活性を有するポリペプチドをコードする DNA 。

項 3.

請求項 2 に記載の DNA を組み込んだベクター。

項 4.

請求項 3 に記載のベクターが導入されている形質転換体。

項 5.

請求項 2 に記載の DNA を保有する微生物を培養し、得られた培養液を精製する、請求項 1 に記載のフラビン結合型グルコース脱水素酵素を製造する方法。

項 6.

請求項 4 に記載の形質転換体を培養し、得られた培養液を精製する、請求項 5 に記載のフラビン結合型グルコース脱水素酵素の製造方法。

項 6.

請求項 1 に記載のフラビン結合型グルコース脱水素酵素をグルコースに作用させることを含む、グルコース濃度の測定方法。

項 7.

請求項 1 に記載のフラビン結合型グルコース脱水素酵素を含むグルコースアッセイキット。

項 8.

請求項 1 に記載のフラビン結合型グルコース脱水素酵素を含むグルコースセンサ。

発明の効果

[0010] 本発明のフラビン結合型グルコース脱水素酵素（F G D H）は、マルトース、D-ガラクトース、D-キシロースに対する反応性がそれぞれ有意に低いいため、試料中にD-グルコースとこれらの糖が共存する場合であってもグルコース量又は濃度を正確に測定することを可能にする。更に、本発明のF G D Hは、熱安定性に優れるため、熱処理等を伴う効率的なセンサストリップの製造を可能にする。加えて、本発明のF G D Hは、広い範囲のpH領域に対して安定であるため、幅広い条件下での使用に適している。これらの特性を備えるため、本発明のF G D Hは、D-グルコースを含むあらゆる試料（例えば、血液や食品（調味料や飲料等））におけるグルコース濃度を正確に測定することを可能にする。

図面の簡単な説明

[0011] [図1] R D O 5 6 7 7 9 由来G D Hの吸収スペクトルを表す図である。
[図2] R D O 5 6 7 7 9 由来G D HのS D S - P A G Eの結果である。
[図3] R D O 5 6 7 7 9 由来G D Hの活性に対するpHの影響を示す。
[図4] R D O 5 6 7 7 9 由来G D Hの活性に対する温度の影響を示す。
[図5] R D O 5 6 7 7 9 由来G D HのpH安定性を測定した結果を示す。
[図6] R D O 5 6 7 7 9 由来G D Hの温度安定性を測定した結果を示す。
[図7] R D O 5 6 7 7 9 由来G D Hの反応速度と基質濃度との関係を示す。

発明を実施するための形態

[0012] 以下、本発明を詳細に説明する。

1. フラビン結合型グルコース脱水素酵素（F G D H）

1-1. グルコース脱水素酵素活性

グルコース脱水素酵素（G D H）とは、電子受容体存在下でグルコースの水酸基を酸化してグルコノーδーラク톤を生成する反応を触媒する理化学的性質を有する酵素である。本書においては、この理化学的性質をグルコースデヒドロゲナーゼ活性といい、特に断りが無い限り、「酵素活性」又は「活性」とは、当該酵素活性を意味する。前記電子受容体は、G D Hが触媒する反応において、電子の授受を担うことが可能である限り特に制限されないが、例えば、2, 6-ジクロロフェノールインドフェノール（D C P I P）、フェナジンメトサルフェート（P M S）、1-メトキシ-5-メチルフェナジウムメチルサルフェート、及びフェリシアン化合物等を使用することができる。

[0013] グルコースデヒドロゲナーゼ活性の測定方法としては、種々の方法が知られているが、本書では、D C P I Pを電子受容体として用い、反応前後における750 nmの波長における試料の吸光度の変化を指標に活性を測定する方法を適用する。具体的な試薬組成や測定条件は、特にことわらない限り下記のとおりである。

[0014] グルコースデヒドロゲナーゼ活性の測定方法

<試薬>

1. 5 M D-グルコースを含む150 mM リン酸緩衝液pH 7. 0（0. 1% T r i t o n X-100を含む）

3. 1 mM 2, 6-ジクロロフェノールインドフェノール（D C P I P）
溶液

上記D-グルコースを含むリン酸緩衝液20 mL、D C P I P溶液10 mL、を混合して反応試薬とする。

[0015] <測定条件>

反応試薬3 mLを37℃で5分間予備加温する。G D H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、750 nmの吸光度変化を5分記録し、直線部分から（即ち、反応速度が一定になってから）1分間あたりの吸光度変化（ $\Delta O D_{T E S T}$ ）を測定する。盲検

はG D H溶液の代わりにG D Hを溶解する溶媒を試薬混液に加えて同様に 1 分間あたりの吸光度変化 ($\Delta O D_{BLANK}$) を測定する。これらの値から次の式に従ってG D H活性を求める。ここでG D H活性における 1 単位 (U) とは、濃度 1 M の D - グルコース存在下で 1 分間に 1 マイクロモルの D C P I P を還元する酵素量である。

活性 (U / mL) =

$$\{ - (\Delta O D_{TEST} - \Delta O D_{BLANK}) \times 3.1 \times \text{希釈倍率} \} / \{ 0.85 \times 0.1 \times 1.0 \}$$

なお、式中の 3.1 は反応試薬 + 酵素溶液の液量 (mL)、0.85 は本活性測定条件におけるミリモル分子吸光係数 ($cm^2 / \text{マイクロモル}$)、0.1 は酵素溶液の液量 (mL)、1.0 はセルの光路長 (cm) を示す。本書においては、別段の表示しない限り、酵素活性は上記の測定方法に従って、測定される。

[0016] 本発明のG D Hは、フラビンを補欠分子族として要求するフラビン結合型のG D H (F G D H) である。

[0017] 本発明のF G D Hは、単離されたF G D H又は精製されたF G D Hであることが好ましい。また、本発明のF G D Hは、上記保存に適した溶液中に溶解した状態又は凍結乾燥された状態 (例えば、粉末状) で存在してもよい。本発明のF G D Hに関して使用する場合の「単離された」とは、当該酵素以外の成分 (例えば、宿主細胞に由来する夾雑タンパク質、他の成分、培養液等) を実質的に含まない状態をいう。具体的には例えば、本発明の単離された酵素は、夾雑タンパク質の含有量が重量換算で全体の約 20 % 未満、好ましくは約 10 % 未満、更に好ましくは約 5 % 未満、より一層好ましくは約 1 % 未満である。一方で、本発明のF G D Hは、保存又は酵素活性の測定に適した溶液 (例えば、バッファー) 中に存在してもよい。

[0018] 1 - 2. ポリペプチド

本発明のFGDHは、下記（a）～（c）のいずれかのポリペプチドで構成されることが好ましい。

（a）配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

（b）配列番号1に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入および／または付加したアミノ酸配列からなり、グルコース脱水素酵素活性を有するポリペプチド；

（c）配列番号1に示されるアミノ酸配列との同一性が80%以上であるアミノ酸配列からなり、グルコース脱水素酵素活性を有するポリペプチド。

配列番号1で示されるアミノ酸配列とは、実施例5に示される通り、*Colletotrichum* RD056779に由来するFGDH（以下、CsGDHとも表す）のアミノ酸配列であり、後述の1-3～1-9の特性を全て満たす。

[0019] 上記（b）のポリペプチドは、グルコース脱水素酵素活性を保持する限度で、配列番号1に示されるアミノ酸において、1若しくは数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入および／または付加（以下、これらを纏めて「変異」とも表す。）されたアミノ酸配列からなるポリペプチドである。

[0020] 当該変異がアミノ酸の置換である場合、置換の種類は、特に制限されないが、FGDHの表現型に顕著な影響を与えないという観点から保存的アミノ酸置換が好ましい。「保存的アミノ酸置換」とは、あるアミノ酸残基を、同様の性質の側鎖を有するアミノ酸残基に置換することをいう。アミノ酸残基はその側鎖によって塩基性側鎖（例えばリシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、 β 分岐側鎖（例えばスレオニン、バリン、イソロイシン）、芳香族側鎖（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）のように、いくつかのファミリーに分類されている。よって、同一のファミリー内のア

ミノ酸残基間で置換されることが好ましい。

[0021] 一又は数個の変異は、制限酵素処理、エキソヌクレアーゼやDNAリガーゼ等による処理、位置指定突然変異導入法やランダム突然変異導入法（Molecular Cloning, Third Edition, Chapter 13, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York）など公知の手法を利用して、後述する本発明のCsGDHをコードするDNAに変異を導入することによって実施することが可能である。また、紫外線照射など他の方法によってもバリエーションを得ることができる。バリエーションには、CsGDHを保持する微生物の個体差、種や属の違いに基づく場合などの天然に生じるバリエーション（例えば、一塩基多型）も含まれる。

[0022] また、FGDHの活性を維持するという観点からは、CsGDHの活性部位又は基質結合部位に影響を与えない部位において上記変異が存在することが好ましい。

[0023] 上記（c）のポリペプチドは、グルコース脱水素酵素活性を保持することを限度で、好ましくは下記1-3～1-9（特に1-3、1-4、1-8、及び1-9）の特性を保持する限度で、配列番号1に示されるアミノ酸配列と比較した同一性が80%以上であるアミノ酸配列からなるポリペプチドである。好ましくは、本発明のFGDHが有するアミノ酸配列と配列番号1に示されるアミノ酸配列との同一性は、85%以上であり、より好ましくは88%以上、更に好ましくは90%以上、より更に好ましくは93%以上、一層好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上、最も好ましくは99%以上である。このような一定以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドは、上述するような公知の遺伝子工学的手法に基づいて作成することができる。

[0024] アミノ酸配列の同一性を算出する方法としては、種々の方法が知られている。例えば、市販の又は電気通信回線（インターネット）を通じて利用可能な解析ツールを用いて算出することができる。

本書では、全米バイオテクノロジー情報センター（NCBI）の相同性アルゴリズムBLAST（Basic local alignment search tool）<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>においてデフォルト（初期設定）のパラメーターを用いることにより、アミノ酸配列の同一性を算出する。

[0025] 1－3. 分子量

本発明のFGDHを構成するポリペプチド部分の分子量は、SDS-PAGEで測定した場合に約65kDaである。「約65kDa」とは、SDS-PAGEで分子量を測定した際に、当業者が、通常65kDaの位置にバンドがあると判断する範囲を含むことを意味する。「ポリペプチド部分」とは、実質的に糖鎖が結合していない状態のFGDHを意味する。微生物によって生産された本発明のFGDHが糖鎖結合型である場合は、それを熱処理や糖加水分解酵素によって処理することにより、糖鎖を除去した状態（即ち、「ポリペプチド部分」）にすることができる。実質的に糖鎖が結合していない状態とは、熱処理や糖加水分解酵素によって処理された糖鎖結合型FGDHに不可避免的に残存する糖鎖の存在を許容する。よって、FGDHが本来的に糖鎖結合型でない場合は、それ自体が「ポリペプチド部分」に相当する。

[0026] 糖鎖結合型FGDHから糖鎖を除去する手段としては、種々の方法が知られている。

本書においては、後述する実施例に示すように、糖鎖結合型のFGDHを100℃で10分間加熱処理をして変性させた後、N-グリコシダーゼEndo H（ニューイングランドバイオラボ社製）を用いて37℃で6時間処理する方法を適用する。

[0027] 本発明のFGDHに糖鎖が結合している場合、その分子量は、グルコース脱水素酵素活性、基質特異性、及び比活性などにネガティブに影響しない限り特に制限されない。例えば、糖鎖が結合した状態の本発明FGDHの分子量は、SDS-PAGEでの測定において、70～90kDaであることが

好ましい。糖鎖結合型のFGDHは、酵素をより安定にするという観点及び水溶性を高め、水に溶け易くするという観点から好ましい。

[0028] SDS-PAGEでの分子量の測定は、一般的な手法及び装置を用い、市販される分子量マーカーを用いて行うことができる。

[0029] 1-4. 基質特異性

本発明のFGDHは、基質特異性に優れている。特に、本発明のFGDHは、D-グルコースに対する反応性を基準とした場合に、少なくともD-キシロースに対する反応性が有意に低い。より具体的に、本発明のFGDHは、同一濃度のD-グルコースに対する反応性を100%とした場合に、D-キシロースに対する反応性が同一濃度のD-グルコースに対する反応性を100%として、好ましくは2%以下であり、より好ましくは1.0%以下、更に好ましくは0.7%以下、更に好ましくは0.5%以下である。

[0030] 本発明のFGDHは、D-キシロースに対する反応性が低いことに加えて、D-ガラクトース及びマルトースに対する反応性も低いことが好ましい。本発明のFGDHのD-ガラクトースに対する反応性は、同一濃度のD-グルコースに対する反応性を100%として、好ましくは2%以下であり、より好ましくは1.0%以下、更に好ましくは0.7%以下、更に好ましくは0.5%以下、更に好ましくは0.2%以下である。

[0031] 本発明のFGDHのマルトースに対する反応性は、同一濃度のD-グルコースに対する反応性を100%として、好ましくは2%以下であり、より好ましくは1.0%以下、更に好ましくは0.7%以下、更に好ましくは0.5%以下、更に好ましくは0.3%以下である。

[0032] 本書において、本発明のFGDHの各糖類に対する反応性は、上記1-1.に示すグルコースデヒドロゲナーゼ活性の測定方法において、D-グルコースを他の糖（例えば、D-キシロース、D-ガラクトース、又はマルトース）に置き換えて、D-グルコースの場合の活性を比較することにより求める。但し、比較する場合の各糖類の濃度は50mMを基準とする。また、基質特異性を測定する際の酵素濃度は、グルコースに対する反応性を測定する

時は、反応液の最終酵素濃度を $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、キシロースやマルトース及びガラクトースに対する反応性を測定する時は $0.5 \text{mg}/\text{ml}$ とする。

[0033] 以上のような優れた基質特異性を有する本発明のFGDHは、試料中のグルコース量を正確に測定するための酵素として好ましい。即ち、本発明のFGDHによれば試料中にマルトース、D-ガラクトース、D-キシロースなどの夾雑物が存在する場合であっても目的のD-グルコースの量を正確に測定することが可能である。従って本酵素は、試料中にこのような夾雑物の存在が予想又は懸念される用途（典型的には血液中のグルコース量の測定）に適しており、当該用途も含め様々な用途に適用可能であり、汎用性が高い。

[0034] 1-5. 比活性

本発明のFGDHは、電気泳動（SDS-PAGE）に供した際に単一のバンドを示す程度に純化された精製標品において、高い比活性を有していることが好ましい。

FGDH精製標品が固体状（粉末状を含む）の場合は、その固体重量をタンパク質重量とみなし、別途酵素活性を測定して比活性を求める。精製標品が液体状の場合は、タンパク質重量をバイオラッド社のタンパク質定量試薬（商品名：バイオラッドプロテインアッセイ濃縮色素試薬）を用いて測定、計算して求める。

本発明のFGDHを精製標品とする場合は、例えば比活性が $30 (\text{U}/\text{mg})$ 以上、さらに好ましくは $50 (\text{U}/\text{mg})$ 以上、さらに好ましくは $80 (\text{U}/\text{mg})$ 以上、さらに好ましくは $100 (\text{U}/\text{mg})$ 以上、さらに好ましくは $130 (\text{U}/\text{mg})$ 以上の状態に精製することが好ましい。比活性の上限は特に限定されないが、好ましくは $200 (\text{U}/\text{mg})$ 以下、さらに好ましくは $180 (\text{U}/\text{mg})$ 以下、さらに好ましくは $160 (\text{U}/\text{mg})$ 以下、さらに好ましくは $150 (\text{U}/\text{mg})$ 以下である。

また、本発明のFGDHの精製標品の最終的な形態は液体状であっても固体状（粉体状を含む）であってもよい。

[0035] 1-6. 至適活性 pH

本発明のFGDHは、後述する実施例に示す通り、pH7.0（リン酸緩衝液）において最も高い活性を示すことが好ましい。また、本発明のFGDHは、pH6.5～8.0の範囲において、pH7.0（リン酸緩衝液）における活性を100%とした場合と比較して、80%以上の相対活性を示すことが好ましい。即ち、本発明のFGDHの至適活性pHは6.5～8.0であり、好ましくはpH7.0である。

[0036] 1-7. 至適活性温度

本発明のFGDHの至適活性温度は、30℃～55℃であることが好ましい。ここで「30℃～55℃」とは、典型的に至適活性温度が30℃～55℃付近であり、更にある程度の許容可能な幅を有することを意味する。本明細書において、至適活性温度は、後述する実施例に示す通り、反応液の最終酵素濃度（0.2 μg/mL）でリン酸カリウム緩衝溶液（pH7.0）中における酵素活性を測定することにより求められる。

[0037] 1-8. pH安定性

本明細書において、特定のpH条件の下、2 U/mLの酵素を25℃で16時間処理した後の残存酵素活性が、処理前の酵素活性と比較して80%以上である場合に、当該酵素は、当該pH条件において安定であると判断する。本発明のFGDHは、少なくともpH3.5～10.0の範囲全体で安定であることが好ましい。

[0038] 1-9. 温度安定性

本明細書において、特定の温度条件の下、適当な緩衝液中（例えば酢酸カリウムバッファー（pH5.0））で2 U/mLの酵素を15分間処理した後の残存酵素活性が、処理前の酵素活性と比較して80%以上である場合に、当該酵素は当該温度条件において安定であると判断する。本発明のFGDHは、少なくとも55℃以下（即ち、0℃～55℃の温度範囲）において安定であることが好ましい。

[0039] 本発明のFGDHは、上記1-3～1-9で示される特徴のうち少なくとも1つ以上を備えていることが好ましく、より好ましくはその2つ以上を備

え、更に好ましくはその3つの特性を更に備え、より更に好ましくはその4つ以上を備え、一層好ましくはその5つ以上を備え、より一層好ましくはその6つ以上を備え、特に好ましくはその全てを備える。本発明のFGDHは、上記1-3～1-9の特性を如何なる組合せで備えていても良いが、上記1-3及び1-4の特性を備えていることが好ましく、更には上記1-3及び1-4の特性に加えて更に1-5、1-8及び1-9からなる群のうち1つ以上の特性を備えていることが好ましい。

[0040] 1-10. 由来

本発明のFGDHは、上述する特性を備える限り、その由来は特に制限されない。本発明のFGDHは、例えば、コレトリカム (*Colletotrichum*) 属及びコレトリカム (*Colletotrichum*) 属の有性世代であるグロメラ (*Glomerella*) 属に帰属する微生物に由来し得る。コレトリカム属に属する微生物としては、特に制限されないが、例えば、*Colletotrichum acutatum*、*Colletotrichum boninense*、*Colletotrichum capsici*、*Colletotrichum circinans*、*Colletotrichum coccodes*、*Colletotrichum dematium*、*Colletotrichum falcatum*、*Colletotrichum gloeosporioides*、*Colletotrichum lindemuthianum*、*Colletotrichum musae*、*Colletotrichum orbiculare*、*Colletotrichum sasaecola*、*Colletotrichum trichellum*、*Colletotrichum trifolii*、*Colletotrichum truncatum*、グロメラ属に属する微生物としては、特に制限されないが、例えば、*Glomerella cingulata*、*Glomerella fructigena*、*Glomerella*

fusarioides、Glomerella glycines、Glomerella gossypii、Glomerella lagenaria及び Glomerella tucumanensisなどが例示できる。更に具体的には、Colletotrichum RD056779を例示することができる。Colletotrichum RD056779は、独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター国際連携課に保管された菌株であり、所定の手続を経ることによってその分譲を受けることができる。

[0041] 本発明のFGDHが由来する他の生物としては、例えば、土壌や河川・湖沼などの水系又は海洋に存在する微生物や各種動植物の表面または内部に常在する微生物等を挙げることができる。低温環境、火山などの高温環境、深海などの無酸素・高圧・無光環境、油田など特殊な環境に生育する微生物を単離源としてもよい。

[0042] 本発明のFGDHには、微生物から直接単離されるFGDHだけでなく、単離されたFGDHを蛋白質工学的な方法によりアミノ酸配列等を改変したものや、遺伝子工学的手法により改変したものも含まれる。例えば、前述の、コレトリカム (Colletotrichum) 属、コレトリカム (Colletotrichum) 属の有性世代であるグロメラ (Glomerella) 属に分類される微生物等から取得した酵素に改変を加えることによって、上述する特性を備えるように改変した酵素であってもよい。

[0043] 2. フラビン結合型グルコース脱水素酵素をコードするDNA

本発明のDNAは、上記1. のFGDHをコードするDNAであり、具体的には以下の(A)～(F)のいずれかである。

(A) 配列番号1に示されるアミノ酸配列をコードするDNA；

(B) 配列番号2に示される塩基配列からなるDNA；

(C) 配列番号2に示される塩基配列との同一性が80%以上である塩基配列を有するDNAであり、且つ、該塩基配列がグルコース脱水素酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNA；

(D) 配列番号 2 に示される塩基配列に相補的な塩基配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有する DNA であり、且つ、該塩基配列がグルコース脱水素酵素活性を有するポリペプチドをコードする DNA ;

(E) 配列番号 2 に示される塩基配列において、1 若しくは数個の塩基が置換、欠失、挿入、付加および／または逆位した塩基配列を有する DNA であり、且つ、該塩基配列がグルコース脱水素酵素活性を有するポリペプチドをコードする DNA ;

(F) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入および／または付加したアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する DNA であり、且つ、該塩基配列がグルコース脱水素酵素活性を有するポリペプチドをコードする DNA。

[0044] 本書において「タンパク質（ポリペプチドまたは FGDH などということもある）をコードする DNA」とは、それを発現させた場合に当該タンパク質が得られる DNA、即ち、当該タンパク質のアミノ酸配列に対応する塩基配列を有する DNA のことをいう。従ってコドンの縮重によって相違する DNA も含まれる。

[0045] 本発明の DNA は、それがコードするアミノ酸配列を有するタンパク質が、グルコース脱水素酵素活性及び好ましくは上記 1-3 ～ 1-9 の特性の少なくとも 1 つ（特に、上記 1-3、1-4、1-5、1-8 及び 1-9 からなる群のうち 1 つ以上の特性）を備える限り、配列番号 2 に示される塩基配列との同一性が 80% 以上、好ましくは 85% 以上、より好ましくは 88% 以上、更に好ましくは 90% 以上、より更に好ましくは 93% 以上、一層好ましくは 95% 以上、特に好ましくは 98% 以上、最も好ましくは 99% 以上である塩基配列を有する。

[0046] 塩基配列の同一性を算出する方法としては、種々の方法が知られている。例えば、市販の又は電気通信回線（インターネット）を通じて利用可能な解析ツールを用いて算出することができる。

本書では、全米バイオテクノロジー情報センター（NCBI）の相同性アルゴリズムBLASTにおいてデフォルト（初期設定）のパラメーターを用いることにより、塩基配列の同一性の値（％）を算出する。

[0047] 本発明のDNAは、それがコードするタンパク質がグルコース脱水素活性を有し、好ましくは上記1-3～1-9の特性、より好ましくは上記1-3、1-4、1-5、1-8及び1-9からなる群のうち1つ以上の特性）の少なくとも1つを備える限り、配列番号2に示される塩基配列に相補的な塩基配列に対してストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAであっても良い。ここで「ストリンジントな条件」とは、一般には、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。このようなストリンジントな条件は当業者に公知であって、例えば、Molecular Cloning (Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York) を参照して設定することができる。

[0048] 本書では、「ストリンジントな条件」とは、以下に示す条件を言う。
ハイブリダイゼーション液として50%ホルムアミド、5×SSC（0.15M NaCl, 15mM sodium citrate, pH 7.0）、1×Denhardt溶液、1%SDS、10%デキストラン硫酸、10μg/mlの変性サケ精子DNA、50mMリン酸バッファー（pH 7.5）を用いる。

[0049] このような条件でハイブリダイズするDNAの中には途中にストップコドンが発生したものや、活性中心の変異により活性を失ったものも含まれ得るが、それらについては、市販の活性発現ベクターに組み込み、適当な宿主で発現させて、酵素活性を公知の手法で測定することによって容易に取り除くことができる。

[0050] 好適な一実施形態において、本発明のFGDHをコードするDNAは、単離された状態で存在するDNAである。ここで「単離されたDNA」とは、天然状態において共存するその他の核酸やタンパク質等の成分から分離された

状態であることをいう。但し、単離されたDNAは、天然状態において隣接する核酸配列（例えばプロモーター領域の配列やターミネーター配列など）など一部の他の核酸成分を含んでいてもよい。例えば染色体DNAの場合の「単離された」状態とは、好ましくは、天然状態において共存する他のDNA成分を実質的に含まない。一方、cDNA分子など遺伝子工学的手法によって調製されるDNAの場合の「単離された」状態では、好ましくは、細胞成分や培養液などを実質的に含まない。同様に、化学合成によって調製されるDNAの場合の「単離された」状態では、好ましくは、dNTPなどの前駆体（原材料）や合成過程で使用される化学物質等を実質的に含まない。尚、それと異なる意味を表すことが明らかでない限り、本明細書において単に「DNA」と記載した場合には単離された状態のDNAを意味する。本発明のDNAには、上記（A）～（F）のDNAと相補的なDNA（cDNA）も含まれる。

[0051] 本発明のDNAは、本明細書又は添付の配列表が開示する配列情報（特に、配列番号2）を基に、化学的DNA合成法により製造、取得することができ、例えば、標準的な遺伝子工学的手法、分子生物学的手法、生化学的手法などを用いることによって容易に調製することができる（Molecular Cloning 3d Ed, Cold Spring Harbor Lab. Press（2001）等参照）。化学的DNA合成法としては、フォスフォアミダイト法による固相合成法を例示することができる。この合成法には自動合成機を利用することができる。

[0052] 標準的な遺伝子工学的手法としては、具体的には、本発明のFGDHが発現される適当な起源微生物より、常法に従ってcDNAライブラリーを調製し、該ライブラリーから、本発明のDNA配列（例えば、配列番号2の塩基配列）に特有の適当なプローブや抗体を用いて所望クローンを選択することにより実施できる〔Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 78, 6613（1981）等参照〕。

[0053] cDNAライブラリーを調整するための起源微生物は、本発明のFGDH

を発現する微生物であれば特に制限されないが、好ましくは、コレトリカム属に分類される微生物である。より具体的には、上記 1-10. に示す微生物を挙げることができる。

[0054] 上記の微生物からの全 RNA の分離、mRNA の分離や精製、cDNA の取得とそのクローニング等は、いずれも常法に従って実施することができる。本発明の DNA を cDNA ライブラリーからスクリーニングする方法も、特に制限されず、通常の方法に従うことができる。例えば、cDNA によって産生されるポリペプチドに対して、該ポリペプチド特異抗体を使用した免疫的スクリーニングにより対応する cDNA クローンを選択する方法、目的のヌクレオチド配列に選択的に結合するプローブを用いたプラークハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーション等やこれらの組合せ等を適宜選択して実施することができる。

[0055] DNA の取得に際しては、PCR 法またはその変法による DNA 若しくは RNA 増幅法が好適に利用できる。殊に、ライブラリーから全長の cDNA が得られ難いような場合には、RACE 法、特に 5' - RACE 法 [M. A. Frohman, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 8, 8998 (1988)] 等の採用が好適である。

[0056] PCR 法の採用に際して使用されるプライマーは、配列番号 2 の塩基配列に基づいて適宜設計し合成することができる。尚、増幅させた DNA 若しくは RNA 断片の単離精製は、前記の通り常法に従うことができ、例えばゲル電気泳動法、ハイブリダイゼーション法等によることができる。

[0057] 本発明の DNA を使用することにより、本発明の FGDH を容易に大量に、安定して製造することができる。

[0058] 3. ベクター

本発明のベクターは、上記 2. で説明する本発明の FGDH をコードする DNA が組み込まれたベクターである。ここで「ベクター」とは、それに挿入された核酸分子を細胞等のターゲット内へと輸送することができる核酸性

分子（キャリアー）であり、適当な宿主細胞内で本発明のDNAを複製可能であり、且つ、その発現が可能である限り、その種類や構造は特に限定されない。即ち、本発明のベクターは発現ベクターである。ベクターの種類は、宿主細胞の種類を考慮して適当なベクターが選択される。ベクターの具体例としては、プラスミドベクター、コスミドベクター、ファージベクター、ウイルスベクター（アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター等）等を挙げることができる。また、糸状菌を宿主とする場合に適したベクターや、セルフクローニングに適したベクターを使用することも可能である。

[0059] 大腸菌を宿主とする場合は、例えば、M13ファージ又はその改変体、 λ ファージ又はその改変体、pBR322又はその改変体（pB325、pAT153、pUC8など）など）を使用することができる。酵母を宿主とする場合は、pYepSec1、pMFA、pYES2等を使用することができる。昆虫細胞を宿主とする場合は、例えば、pAc、pVL等が使用でき、哺乳類細胞を宿主とする場合は、例えば、pCDM8、pMT2PC等を使用することができるが、これらに限定される訳ではない。

[0060] 発現ベクターは通常、挿入された核酸の発現に必要なプロモーター配列や発現を促進させるエンハンサー配列等を含む。選択マーカを含む発現ベクターを使用することもできる。かかる発現ベクターを用いた場合には選択マーカを利用して発現ベクターの導入の有無（及びその程度）を確認することができる。本発明のDNAのベクターへの挿入、選択マーカ遺伝子の挿入（必要な場合）、プロモーターの挿入（必要な場合）等は標準的な組換えDNA技術（例えば、Molecular Cloning, Third Edition, 1.84, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New Yorkを参照することができる、制限酵素及びDNAリガーゼを用いた周知の方法）を用いて行うことができる。

[0061] 4. 形質転換体

本発明は、宿主細胞に本発明のDNAが導入された形質転換体に関する。本発明のDNAの宿主への導入手段は特に制限されないが、例えば、上記3. で説明するベクターに組み込まれた状態で宿主に導入される。宿主細胞は、本発明のDNAを発現してFGDHを生産することが可能である限り、特に制限されない。具体的には、大腸菌、枯草菌等の原核細胞や、酵母、カビ、昆虫細胞、植物培養細胞、哺乳動物細胞等の真核細胞等を使用することができる。

宿主が原核細胞の場合は、エシェリヒア属、バチルス属、ブレヴィバチルス属、コリネバクテリウム属などが例として挙げられ、それぞれ、エシェリヒア・コリC600、エシェリヒア・コリHB101、エシェリヒア・コリDH5 α 、バチルス・サブチリス、ブレヴィバチルス・チョウシネンシス、コリネバクテリウム・グルタミカムなどが例として挙げられる。また、ベクターとしてはpBR322、pUC19、pBluescriptなどが例として挙げられる。

宿主が酵母の場合は、サッカロミセス属、シゾサッカロミセス属、キャンディダ属、ピキア属、クリプトコッカス属などが例として挙げられ、それぞれ、サッカロミセス・セレビシエ、シゾサッカロミセス・ポンベ、キャンディダ・ウチリス、ピキア・パストリス、クリプトコッカス・エスピーなどが例として挙げられる。ベクターとしてはpAUR101、pAUR224、pYE32などが挙げられる。

宿主が糸状菌細胞である場合は、アスペルギルス属、トリコデルマ属、コレトトリカム属などが例として挙げられ、それぞれ、アスペルギルス・オリゼ、アスペルギルス・ニガー、トリコデルマ・レセイ、コレトトリカム・ヒエマリス等を例示することができる。

[0062] 本発明においては、FGDHが単離されたコレトトリカム属に帰属する微生物を宿主とすることも好ましい。即ち、形質転換体では、通常、外来性のDNAが宿主細胞中に存在するが、DNAが由来する微生物を宿主とするいわゆるセルフクローニングによって得られる形質転換体も好適な実施形態であ

る。

[0063] 本発明の形質転換体は、好ましくは、上記 3. に示される発現ベクターを用いたトランスフェクション乃至はトランスフォーメーションによって調製される。形質転換は、一過性であっても安定的な形質転換であってもよい。トランスフェクション及びトランスフォーメーションはリン酸カルシウム共沈降法、エレクトロポレーション、リポフェクション、マイクロインジェクション、H a n a h a n の方法、酢酸リチウム法、プロトプラスターポリエチレングリコール法、等を利用して実施することができる。

[0064] 本発明の形質転換体は、本発明の F G D H を産生する能力を有するため、それを用いて効率的に本発明の F G D H を製造することが可能となる。

[0065] 5. フラビン結合型グルコース脱水素酵素の製造方法

本発明の F G D H は、典型的には、本発明の F G D H の生産能を有する微生物を培養することで製造される。培養に供される微生物は、本発明の F G D H を産生する能力を有する限り特に制限されず、例えば、上記 1. に示すコレトリカム属に帰属する野生型の微生物及び上記 4. に示す形質転換体を好適に利用することができる。

[0066] 上記のコレトリカム (C o l l e t o t r i c h u m) 属に分類される微生物は、例えば、独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター国際連携課に保管された菌株であり、所定の手続を経ることによってその分譲を受けることができる。

[0067] 培養方法及び培養条件は、本発明の F G D H が生産される限り特に限定されない。即ち、F G D H が生産されることを条件として、使用する微生物の生育に適合した方法及び条件を適宜設定できる。以下に、培養条件として、培地、培養温度、及び培養時間を例示する。

[0068] 培地としては、使用する微生物が生育可能な培地であれば、特に制限されない。例えば、グルコース、シュクロース、ゲンチオビオース、可溶性デンプン、グリセリン、デキストリン、糖蜜、有機酸等の炭素源、更に硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、ある

いは、ペプトン、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、ふすま、肉エキス等の窒素源、更にカリウム塩、マグネシウム塩、ナトリウム塩、リン酸塩、マンガン塩、鉄塩、亜鉛塩等の無機塩を添加したものをを用いることができる。使用する微生物の生育を促進するためにビタミン、アミノ酸などを培地に添加してもよい。

[0069] コレトトリカム (*Colletotrichum*) 属に分類される微生物を培養して本発明のFGDHを得る場合は、その微生物の栄養生理的性質を考慮して培養条件を選択すればよい。多くの場合は液体培養で行い、工業的には通気攪拌培養を行うのが有利である。ただし、生産性を考えた場合に、固体培養で行った方が有利な場合もある。

[0070] 培地のpHは、培養する微生物の生育に適していればよく、例えば約3~8、好ましくは約5~7程度に調整し、培養温度は通常約10~50℃、好ましくは約25~35℃程度で、1~15日間、好ましくは3~7日間程度好氣的条件下で培養する。培養法としては例えば振盪培養法、ジャー・フェーマンターによる好氣的深部培養法が利用できる。

[0071] 上記のような条件で培養した後、培養液又は菌体よりFGDHを回収することが好ましい。FGDHを菌体外に分泌する微生物を用いる場合は、例えば培養上清をろ過、遠心処理等することによって不溶物を除去した後、限外ろ過膜による濃縮、硫酸沈殿等の塩析、透析、各種クロマトグラフィーなどを適宜組み合わせて分離、精製を行うことにより本酵素を得ることができる。コレトトリカム属に属する微生物が産生するフラビン結合型グルコース脱水素酵素は基本的に分泌型のタンパク質である。

[0072] 他方、菌体内から回収する場合には、例えば菌体を加圧処理、超音波処理、機械的手法、又はリゾチーム等の酵素を利用した手法等によって破砕した後、必要に応じて、EDTA等のキレート剤及び界面活性剤を添加してFGDHを可溶化し、水溶液として分離採取し、分離、精製を行うことにより本酵素を得ることができる。ろ過、遠心処理などによって予め培養液から菌体を回収した後、上記一連の工程（菌体の破砕、分離、精製）を行ってもよい。

[0073] 精製は、例えば、減圧濃縮、膜濃縮、さらに硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどの塩析処理、あるいは親水性有機溶媒、例えばメタノール、エタノール、アセトンなどによる分別沈殿法により沈殿処理、加熱処理や等電点処理、吸着剤あるいはゲルろ過剤などによるゲルろ過、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等を適宜組み合わせて実施することができる。

[0074] カラムクロマトグラフィーを用いる場合は、例えば、セファデックス (Sephadex) ゲル (GEヘルスケア バイオサイエンス社製) などによるゲルろ過、DEAEセファロースCL-6B (GEヘルスケア バイオサイエンス社製)、オクチルセファロースCL-6B (GEヘルスケア バイオサイエンス社製) 等を用いることができる。該精製酵素標品は、電気泳動 (SDS-PAGE) 的に単一のバンドを示す程度に純化されていることが好ましい。

[0075] なお、培養液からのグルコース脱水素酵素活性を有するタンパク質の採取 (抽出、精製など) にあたっては、グルコース脱水素酵素活性、マルトース作用性、熱安定性などのうちいずれか1つ以上を指標に行ってもよい。

[0076] 各精製工程では原則としてGDH活性を指標として分画を行い、次のステップへと進む。但し、予備試験などによって、適切な条件を予め設定可能な場合にはこの限りでない。

[0077] 組換えタンパク質として本酵素を得ることにすれば種々の修飾が可能である。例えば、本酵素をコードするDNAと他の適当なDNAとを同じベクターに挿入し、当該ベクターを用いて組換えタンパク質の生産を行えば、任意のペプチドないしタンパク質が連結された組換えタンパク質からなる本酵素を得ることができる。また、糖鎖及び／又は脂質の付加や、あるいはN末端若しくはC末端のプロセッシングが生ずるような修飾を施してもよい。以上のような修飾により、組換えタンパク質の抽出、精製の簡便化、又は生物学的機能の付加等が可能である。

[0078] 6. グルコースの測定方法

グルコースデヒドロゲナーゼを用いたグルコースの測定方法は既に当該技術分野において確立されている。よって、公知の方法に従い、本発明のF G D Hを用いて、各種試料中のグルコースの量又は濃度を測定することができる。本発明のF G D Hを用いてグルコースの濃度又は量が測定可能である限り、その態様は特に制限されないが、例えば、本発明のF G D Hを試料中のグルコースに作用させ、グルコースの脱水素反応に伴う電子受容体（例えば、D C P I P）の構造変化を吸光度で測定することにより実施することができる。より具体的には、上記1-1. に示す方法に従って、実施することができる。本発明に従った、グルコース濃度の測定は、試料に本発明のF G D Hを添加すること、又は添加して混合することにより実施することができる。グルコースを含有する試料は、特に制限されないが、例えば、血液、飲料、食品等を挙げることができる。グルコース濃度又は量の測定が可能である限り、試料に添加する酵素の量はと特に制限されない。

[0079] 後述するセンサの形態でのグルコース濃度の測定は、例えば、以下のようにして実施することができる。恒温セルに緩衝液を入れ、一定温度に維持する。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F G D H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A g / A g C l 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。

[0080] 7. グルコースアッセイキット

本発明のグルコースアッセイキットは、本発明のF G D Hを少なくとも1回のアッセイに十分な量で含む。典型的には、キットは、本発明のF G D Hに加えて、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、ならびに使用の指針を含む。本発明のF G D Hは種々の形態で、例えば、凍結乾燥された試薬として、または

適切な保存溶液中の溶液として提供することができる。

[0081] 8. グルコースセンサ

本発明はまた、本発明のF G D Hを用いるグルコースセンサを提供する。本発明のグルコースセンサは、電極として、カーボン電極、金電極、白金電極などを用い、この電極上に本発明の酵素を固定化することで作製することができる。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る。その他、フェロセン又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。本発明のF G D Hは、熱安定性に優れるため、比較的高温度（例えば、50℃や55℃）の条件下で固定化を実施することができる。典型的には、グルタルアルデヒドを用いて本発明のF G D H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ことができる。

[0082] センサーを用いたグルコース濃度の測定は、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。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F G D H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A g / A g C l 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。

[0083] 以下に、本発明を実施例により具体的に説明する。以下の実施例の記載はいかなる面においても本発明を限定しない。

実施例

[0084] 実施例1 菌株の復元

独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター国際連携課から、コレトリカム属に帰属する菌株を入手した。入手した菌株は25℃で3日間から7日間、静置培養することで復元させた。復元培地としては、DP培地（デキストリン2.0%、ポリペプトン1.0%、 KH_2PO_4 1.0%、アガロース1.5%）を使用した。

[0085] 実施例2 培養上清の回収

小麦胚芽2g、2%グルコース溶液2mLを含む培地をオートクレーブで120℃、20分間滅菌した固体培地に、実施例1で復元させたコレトリカム属の各菌株を一白金耳植菌し、25℃で5日間から7日間静置培養した。培養後、50mMリン酸カリウム緩衝液（pH6.5）を1mL添加し、ボルテックスで十分に懸濁した。懸濁液に少量のガラスビーズを加えた後、ビーズショッカー（安井器械（株）製）で3,000rpm、3分間×2回の条件で破碎し、4℃、2,000×g、5分間の条件で遠心分離して、回収した上清を粗酵素液とした。

[0086] 実施例3 グルコース脱水素酵素活性の確認

実施例2で得た粗酵素液中のグルコース脱水素酵素活性を、上記1-1.に示したグルコースデヒドロゲナーゼ活性測定方法を用いて測定した。その結果を表1に示す。

[0087] [表1]

菌株名	活性 (U/ml)
Colletotrichum属 (RD056779株)	0.38

[0088] 表1に示す通り、Colletotrichum RD056779由来の粗酵素液にGDH活性が存在することが確認された。

[0089] 実施例4 Colletotrichum RD056779由来GDHの精製

50mLのYPD培地（0.5%酵母エキス、1%ペプトン、2%グルコース）を500mL坂口フラスコに入れ、オートクレーブで滅菌し、前培養

用の培地とした。予めDPプレート培地で復元した*Colletotrichum RD056779*を前培養培地に一白金耳植菌し、25℃、180 rpmで5日間振とう培養し、種培養液とした。

[0090] 次に、6.0Lの生産培地（イーストエクストラクト3.0%、グリセロール3.0%、pH6.0）を10L容ジャーファーマンターに入れ、オートクレーブで滅菌し、本培養培地とした。50mLの種培養液を本培養培地に植菌し、培養温度25℃、攪拌速度400 rpm、通気量2.0L/分、管内圧0.2MPaの条件で5日間培養した。その後、培養液をろ過し、そのろ液を分画分子量30,000のUF膜（ミリポア（株）製）を用いて濃縮し、濃縮液に50mMリン酸緩衝液（pH6.0）を加えるという工程を繰り返し、低分子を取り除いた。

[0091] その後、脱塩液に0.4飽和になるように硫酸アンモニウムを徐々に添加し、予め0.4飽和の硫酸アンモニウムを含む50mMリン酸カリウム緩衝液（pH6.0）で平衡化した400mLのPSセファロースFast Flow（GEヘルスケア製）カラムにかけ、50mMリン酸緩衝液（pH6.0）のリニアグラジエントで溶出させた。そして、溶出されたGDH画分を分画分子量10,000の中空糸膜（スペクトラムラボラトリーズ製）で濃縮後、50mMリン酸カリウム緩衝液（pH6.0）で平衡化したDEAEセファロースFast Flow（GEヘルスケア製）カラムにかけ、0.5MのNaClを含む50mMリン酸緩衝液（pH6.0）のリニアグラジエントで溶出させた。さらに、0.4飽和の硫酸アンモニウムを含む50mMリン酸カリウム緩衝液（pH6.0）で平衡化した5mLのResource Phe（GEヘルスケア製）カラムにかけ、精製酵素を得た。得られた精製酵素をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（Phast Gel 10-15% Phast system GEヘルスケア製）に供した。この際、タンパク質分子量マーカーとしてフォスフォリラーゼb（97,400ダルトン）、ウシ血清アルブミン（66,267ダルトン）、アルドラーゼ（42,400ダルトン）、カルボニックアンヒドラーゼ（30,0

00ダルトン)、トリプシンインヒビター(20, 100ダルトン)を用いた。

[0092] その結果、単一のバンドが得られたことから、GDHが十分に精製されていることを確認した。分子量マーカと比較した移動度から、精製したGDHの分子量は78,000~90,000ダルトンであることが判明した。

[0093] 実施例5 フラビン結合型酵素であることの確認

実施例4で精製した酵素を50mM

リン酸緩衝液(pH7.0)で透析し、300~600nmにおける吸収スペクトルを分光光度計U-3210(日立ハイテクノロジーズ社製)により測定した。その結果、波長380~390nm付近および波長450~470nm付近に極大を示す2つのピークが確認された(図1)。このような吸収スペクトルの形状から、本発明のGDHがフラビン結合型タンパク質(すなわちFGDH)であることが強く示唆された(以下このGDHをCsGDHとも表す。)

[0094] 実施例6 単離されたCsGDHのペプチド部分の分子量

[0095] 実施例4で精製したCsGDHを100℃、10分間、加熱処理して変性させた後、5UのEndo H(ニューイングランドバイオラボ社製)で37℃、1時間処理し、タンパク質に付加している糖鎖を分解した。その後、実施例4と同様の方法でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で測定を行った。分子量マーカは、実施例4と同じものを使用した。その結果、精製したCsGDHのポリペプチド部分の分子量は約65,000ダルトンであることが判明した。電気泳動の結果を図2に示す。

[0096] 実施例6 基質特異性

上記1-1.に示したGDHの活性測定法に従い、実施例4で精製したCsGDHについて、D-グルコース、マルトース、D-ガラクトース、D-キシロースを基質とした場合の活性を測定した。D-グルコースを基質とした場合の活性を100%とし、それと比較した他の糖に対する活性を求めた。各糖の濃度は50mMとした。結果を表2に示す。なお、酵素濃度につい

ては、グルコースに対しては最終濃度 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、それ以外の糖については、最終濃度 $0.5 \text{mg}/\text{mL}$ の濃度で反応を行った。また、本実施例については、下記の酵素活性測定条件で測定した。

100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 1.79 mL、1.25 M D-グルコース溶液

0.08 mL および 20 mM DCPIP 溶液 0.01 mL を混合し、37℃で5分間保温する。次いで、20 mM PMS 溶液 0.02 mL およ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 (ΔA_{600}) を求め、次式に従いフラビン結合型GDH活性を算出する。この際、フラビン結合型GDH活性は、37℃において濃度 50 mM のD-グルコース存在下で1分間に $1 \mu\text{mol}$ のDCPIPを還元する酵素量を1Uと定義する。

活性 (U/mL) =

$$\{ - (\Delta \text{OD}_{\text{TEST}} - \Delta \text{OD}_{\text{BLANK}}) \times 2.0 \times \text{希釈倍率} \} / \{ 16.3 \times 0.1 \times 1.0 \}$$

なお、式中の2.0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)、 $\Delta \text{OD}_{\text{BLANK}}$ は10 mM

酢酸緩衝液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を表す。

[0097]

[表2]

糖の種類	相対活性 (%)
D-Glucose	100.0
Maltose	0.3%以下
D-Galactose	0.2%以下
D-Xylose	0.5%以下

[0098] 表2の結果から、精製C s G D Hの基質特異性は、D-グルコースに対する活性値を100%とした場合、マルトース、D-ガラクトース、D-キシロースに対する見かけの活性は、それぞれ0.3%以下、0.2%以下、0.5%以下であり、本発明のC S G D Hは基質特異性に優れていることが示された。

[0099] 実施例7 至適活性pH

実施例4で得られた精製C s G D H酵素液(0.5 U/mL)を用いて、至適pHを調べた。100 mM 酢酸カリウム緩衝液(pH 5.0-5.5、図中■印でプロット)、100 mM M E S - N a O H緩衝液(pH 5.5-6.5、図中□印でプロット)、100 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 6.0-8.0、図中▲でプロット)を用い、それぞれのpHにおいて、温度37℃にて酵素反応を行い、相対活性を比較した。結果を図3に示す。

[0100] その結果、精製C s G D Hの至適活性pHは、リン酸カリウム緩衝液を使用した場合のpH 7.0において最も高い活性値を示した。また、pH 6.5~8.0の範囲で、pH 7.0における活性を100%とした場合と比較して80%以上の相対活性を示した。以上のことから、精製C s G D Hの至適活性pHはpH 6.5~8.0であることが示された。

[0101] 実施例8 至適活性温度

実施例4で得られた精製CsGDH酵素液（ $3.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）を用いて、至適活性温度を調べた。 25°C 、 30°C 、 37°C 、 40°C 、 46°C 、 49°C 、 50°C 、 55°C 、 60°C における活性を求めた。結果を図4に示す。なお、本実施例については、下記の酵素活性測定条件で測定した。

100 mM リン酸緩衝液（ $\text{pH} 7.0$ ） 1.79 mL、1.25 M D-グルコース溶液

0.08 mL および 20 mM DCPIP 溶液 0.01 mL を混合し、 37°C で5分間保温する。次いで、20 mM PMS 溶液 0.02 mL およ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（ ΔA_{600} ）を求め、次式に従いフラビン結合型GDH活性を算出する。この際、フラビン結合型GDH活性は、 37°C において濃度50 mMのD-グルコース存在下で1分間に $1 \mu\text{mol}$ のDCPIPを還元する酵素量を1 Uと定義する。

活性（U/mL）＝

$$\{ - (\Delta OD_{\text{TEST}} - \Delta OD_{\text{BLANK}}) \times 2.0 \times \text{希釈倍率} \} / \{ 16.3 \times 0.1 \times 1.0 \}$$

なお、式中の2.0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）、 ΔOD_{BLANK} は10 mM

酢酸緩衝液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を表す。

[0102] その結果、精製CsGDHは、 46°C ～ 49°C の範囲で最も高い活性値を

示し、最大の活性値に対して80%以上の相対活性を示す温度範囲は46℃～58℃であった。以上のことから、精製CsGDHの至適活性温度は46℃～58℃であることが示された。

[0103] 実施例9 pH安定性

実施例4で得られた精製CsGDH酵素液(2U/mL)を用いて、pH安定性を調べた。100mM グリシン-HCl緩衝液(pH2.5-pH3.5: 図中■印でプロット) 100mM 酢酸-カリウム緩衝液(pH3.0-pH5.5: 図中□印でプロット)、100mM MES-NaOH緩衝液(pH5.5-pH6.5: 図中▲印でプロット)、100mM リン酸カリウム緩衝液(pH6.0-pH8.0: 図中△印でプロット)、100mM Tris-HCl緩衝液(pH7.5-pH9.0: 図中●印でプロット)、100mM グリシン-NaOH緩衝液(pH9.0-pH10.5: 図中○印でプロット)を用い、25℃、16時間、各緩衝液中で酵素を維持した後のグルコースを基質とした場合の活性を測定した。処理後の活性値と処理前の活性値を比較し、残存活性率を求めた。結果を図5に示す。

[0104] その結果、精製CsGDHは、pH3.5～pH10.0の範囲で80%以上の活性残存率を示した。以上のことから、精製CsGDHの安定pH域はpH3.5～pH10.0であることが示された。

[0105] 実施例10 温度安定性

実施例4で得られた精製CsGDH酵素液(2U/mL)を用いて、温度安定性を調べた。100mM酢酸カリウム緩衝液(pH5.0)を用いて、CsGDH酵素液を各温度(4℃、30℃、40℃、50℃、55℃、60℃、65℃、70℃)で15分間処理した後、GDH活性を測定し、処理前のGDH活性と比較して残存率を測定した。結果を図6に示す。

[0106] その結果、精製CsGDHは、4℃～55℃の範囲の温度での処理後、80%以上の残存率を有していた。以上のことから、精製CsGDHは、55℃以下で安定であることが示された。

なお、図6によれば、精製CsGDHは、4℃～50℃の範囲の温度での

処理後では、90%以上の残存率を有しており、50℃以下ではきわめて安定であることが示された。

[0107] 実施例 1 1 比活性の測定

実施例 4 で得られた精製 CsGDH 酵素液 (7 μ g/mL) を用いて、電子受容体として DCPIP のみを用いる方法で、グルコースデヒドロゲナーゼ活性を調べた。その結果、比活性は 138 (U/mg) と計算された。また、特許文献、WO 2011/068050 A1 に記載のアスペルギルス・ニガー由来グルコースオキシダーゼの変異酵素 (D446H および V582P の二重変異体) は、本発明同様に、基質特異性に優れた酵素であるが、特許文献に記載の通り、サッカロマイセス・セルビジエで発現させ、各種、クロマトグラフィーにより、変異酵素を調製し、上記、同条件でグルコースデヒドロゲナーゼ活性を測定した結果、比活性は 27 (U/mg) と計算された。よって、本発明の CsGDH は、基質特異性のみならず、比活性の点でも優れていることが確認された。

[0108] 実施例 1 2 コレトトリカム属由来フラビン結合型 GDH 遺伝子のクローニングと形質転換体による発現

(1) Total-RNA の調製

Colletotrichum RD056779 株を GDH 生産培地 (イーストイクトラクト 3.0%、グリセロール 3.0%、pH 6.0) 60 mL に接種し、5 日、25℃ で振とう培養した。この培養液を濾紙濾過し、菌糸体を回収した。得られた菌糸を液体窒素中で凍結させ、乳鉢を用いて菌糸を粉砕した。次いで、ホットフェノール法により、粉砕した菌体から Total-RNA を得た。

[0109] (2) GDH 部分アミノ酸配列の決定

実施例 4 より得られた精製 CsGDH を Nu-PAGE 4-12% Bis-Tris Gel (Invitrogen 社製) を用いた SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。電気泳動後のゲルを Simply Blue Safe Stain (Invitrogen 社製) を用いて

染色し、当該酵素の分子量に相当するバンド部分を切り出した。切り出したゲル断片を外部機関に委託し、その中に含まれるタンパク質の内部アミノ酸配列情報を取得した。その結果、得られたアミノ酸配列は、K G T A D W S W D G I L P F F K K（配列番号3）およびK Y D A S Y W G D S S E I Y A G W P R（配列番号4）であった。

[0110] （3）GDH遺伝子配列の決定

上記の部分アミノ酸配列情報に基づき、ミックス塩基を含有するディジェネレートプライマー（プライマーの一例を配列番号5（フォワードプライマー）、配列番号6（リバースプライマー）に示す）を作製した。なお、配列番号5および6に記載の1文字表記において、混合塩基はそれぞれ、 $h = a + c + t$ 、 $r = a + g$ 、 $y = c + t$ 、 $d = a + g + t$ を表す。上記（1）にて調製した*Colletotrichum* RD056779株のTotal RNAをテンプレートとし、Smarter RACE cDNA Amplification kit（クロンテック社製）を用いて、本キットのプロトコールに従ってRT-PCRを行った。PCRによるcDNA増幅には配列番号5、6に示すディジェネレートプライマーを用いた。反応液をアガロースゲル電気泳動に供したところ、100bp程度の長さに相当するシングルバンドが確認された。このバンドに含まれる増幅DNA断片を精製し、Target clone-plus（東洋紡績社製）を用いて、pTA2（東洋紡績社製）に前記増幅DNA断片をライゲーションすることにより、組換えプラスミドpTA-C56779GDHpartialを構築した。

[0111] 次いで、得られたpTA-C56779GDHpartialを用い、公知のヒートショック法により大腸菌DH5 α コンピテントセル（東洋紡績社製）を形質転換した。得られた形質転換体からMagExtractor-Plasmid（東洋紡績社製）を用いてプラスミドを抽出・精製し、プラスミド中に含まれる前記増幅DNA断片の塩基配列を決定した（111bp）。

[0112] 得られた前記増幅DNA断片の配列情報を元に、Smarter RACE cDNA Amplification kit (クロンテック社製) を用いて3'側及び5'側のGDH遺伝子未知領域を決定した。いずれも各キットのプロトコールに従い、3' RACEでは本キット付属のUniversal Primer A Mixおよび配列番号7に示すプライマーを用いて1st PCRを行い、続いて、本キット付属のNested Universal Primer Aおよび配列番号8に示すプライマーを用いてNested PCRを行った。5' RACEでは本キット付属のUniversal Primer A Mixおよび配列番号9に示すプライマーを用いて1st PCRを行い、続いて、本キット付属のNested Universal Primer Aおよび配列番号10に示すプライマーを用いてNested PCRを行った。前記の方法に従って得られた複数のプラスミド中に含まれるDNA断片の塩基配列解析を行った結果、配列番号2に示す全鎖長1908bpのColletotrichum由来GDH遺伝子配列が明らかとなった。当該遺伝子配列により予測した当該酵素遺伝子のアミノ酸配列を配列番号1に示す。

[0113] この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。

[0114] 本明細書の中で明示した論文、公開特許公報、及び特許公報などの内容は、その全ての内容が援用によってここに取り込まれる。

産業上の利用可能性

[0115] 本発明のCsGDHは基質特異性に優れ、グルコース量をより正確に測定することを可能にする。従って本発明のCsGDHは血糖値の測定などに好適といえる。

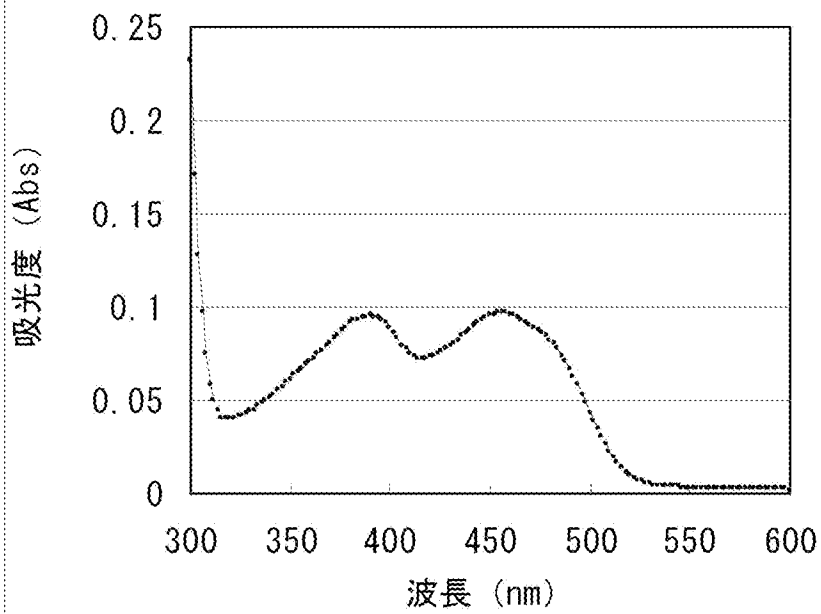
請求の範囲

- [請求項1] 下記の（a）～（c）のいずれかのポリペプチドからなるフラビン結合型グルコース脱水素酵素；
- （a）配列番号 1 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド
 - （b）配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加および／または逆位したアミノ酸配列からなり、かつ、グルコース脱水素酵素活性を有するポリペプチド
 - （c）配列番号 1 に示されるアミノ酸配列との同一性が 80% 以上であるアミノ酸配列からなり、かつ、グルコース脱水素酵素活性を有するポリペプチド
- [請求項2] 以下の（A）～（F）のいずれかの DNA：
- （A）配列番号 1 に示されるアミノ酸配列をコードする DNA、
 - （B）配列番号 2 に示される塩基配列からなる DNA、
 - （C）配列番号 2 に示される塩基配列との同一性が 80% 以上である塩基配列からなり、かつ、グルコース脱水素酵素活性を有するポリペプチドをコードする DNA；
 - （D）配列番号 2 に示される塩基配列に相補的な塩基配列に対してストリンジントな条件下でハイブリダイズする DNA であり、かつ、グルコース脱水素酵素活性を有するポリペプチドをコードする DNA、
 - （E）配列番号 2 に示される塩基配列において、一若しくは数個の塩基が置換、欠失、挿入、付加及び／又は逆位されている塩基配列であり、かつ、グルコース脱水素酵素活性を有するポリペプチドをコードする DNA、
 - （F）配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、付加、又は逆位したアミノ酸配列からなり、かつ、グルコース脱水素酵素活性を有するポリペプチド

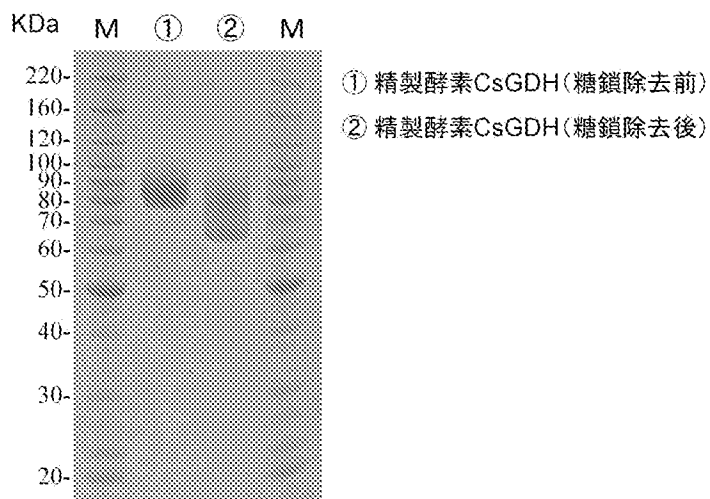
をコードするDNA。

- [請求項3] 請求項2に記載のDNAを組み込んだベクター。
- [請求項4] 請求項3に記載のベクターが導入されている形質転換体。
- [請求項5] 請求項2に記載のDNAを保有する微生物を培養し、得られた培養液を精製する、請求項1に記載のフラビン結合型グルコース脱水素酵素を製造する方法。
- [請求項6] 請求項4に記載の形質転換体を培養し、得られた培養液を精製する、請求項5に記載のフラビン結合型グルコース脱水素酵素の製造方法。
- [請求項7] 請求項1に記載のフラビン結合型グルコース脱水素酵素をグルコースに作用させることを含む、グルコース濃度の測定方法。
- [請求項8] 請求項1に記載のフラビン結合型グルコース脱水素酵素を含むグルコースアッセイキット。
- [請求項9] 請求項1に記載のフラビン結合型グルコース脱水素酵素を含むグルコースセンサ。

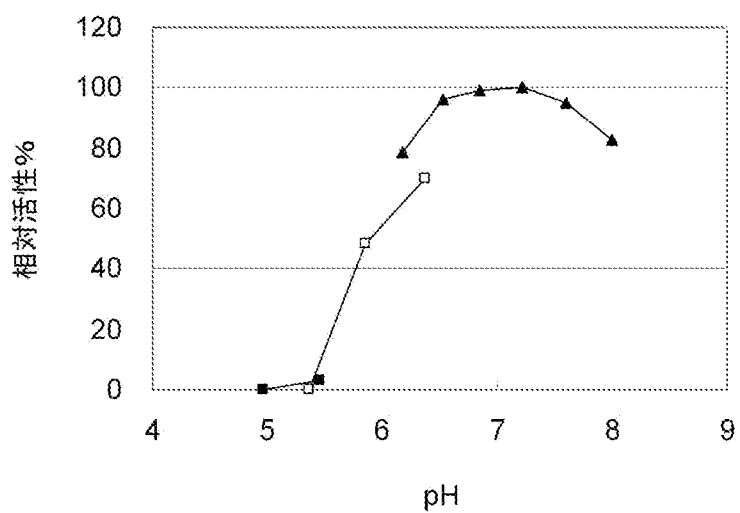
[図1]



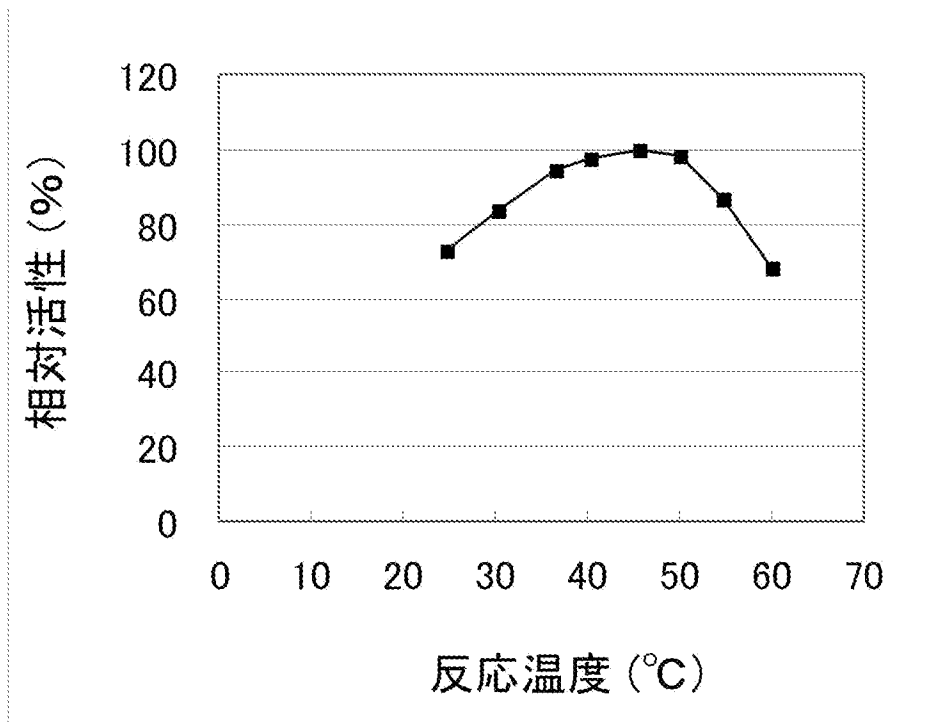
[図2]



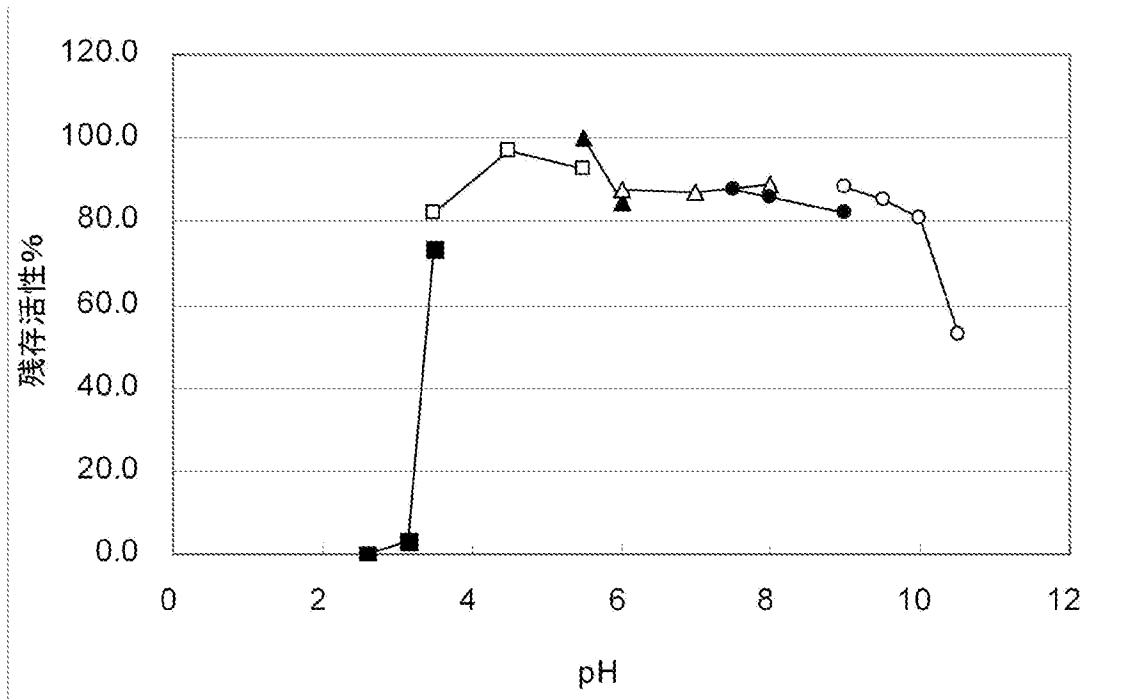
[図3]



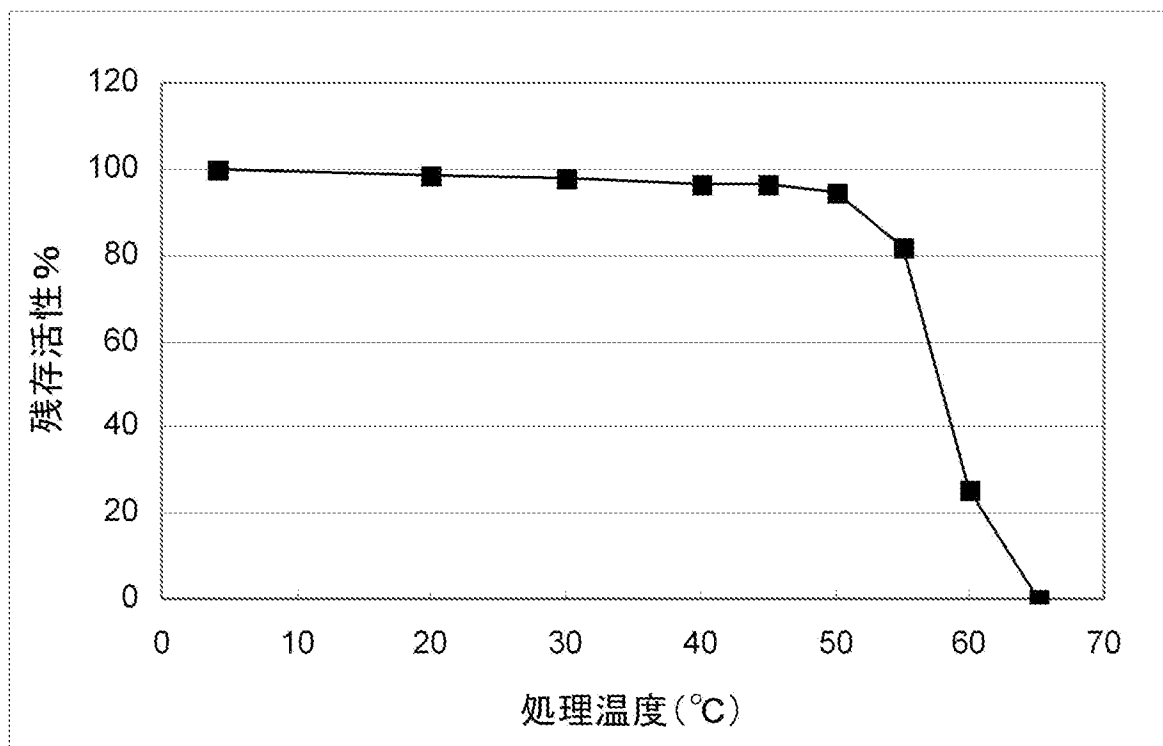
[図4]



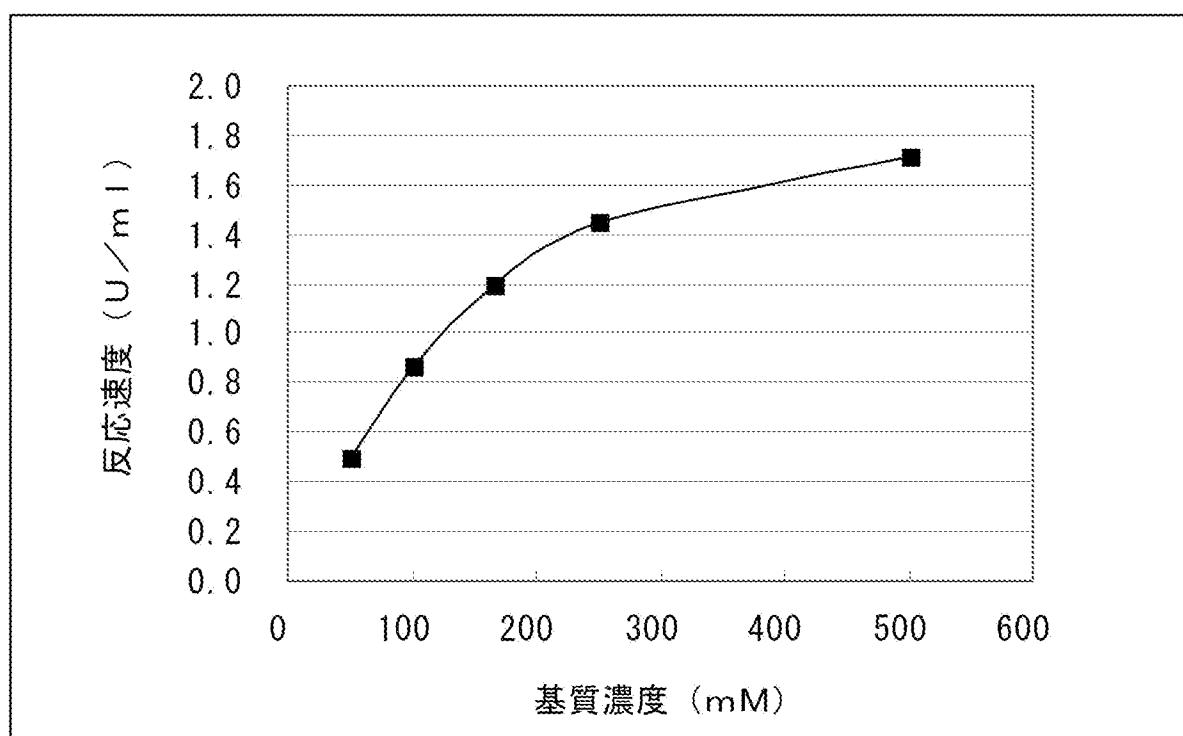
[図5]



[図6]



[図7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/067309

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

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

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)

GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, CAPUS/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZAFAR, M. N., et al., 'Electron-Transfer Studies with a New Flavin Adenine Dinucleotide Dependent Glucose Dehydrogenase and Osmium Polymers of Different Redox Potentials', Analytical Chemistry, 2011.12.05, Vol. 84, pp. 334-341	1-9
A	SYGMUND, C., et al., 'Heterologous overexpression of Glomerella cingulata FAD-dependent glucose dehydrogenase in Escherichia coli and Pichia pastoris', Microbial Cell Factories, 2011, Vol. 10, pp.1-6	1-9



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
12 July, 2013 (12.07.13)

Date of mailing of the international search report
23 July, 2013 (23.07.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/067309

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SYGMUND, C., et al., 'Reduction of quinones and phenoxy radicals by extracellular glucose dehydrogenase from Glomerella cingulata suggests a role in plant pathogenicity', Microbiology, 2011, Vol. 157, pp.3203-3212	1-9
A	WO 2011/068050 A1 (Amano Enzyme Inc.), 09 June 2011 (09.06.2011), paragraphs [0009] to [0014] & US 2012/0244565 A1 & EP 2508600 A1	1-9
A	WO 2010/140431 A1 (Kikkoman Corp.), 09 December 2010 (09.12.2010), examples 1 to 3, 7 & JP 4648993 B & US 2011/0318810 A1 & EP 2348108 A1	1-9
P,X	GAN, P.H.P., et al., Database accession no. ELA34144, 'choline dehydrogenase [Colletotrichum gloeosporioides Nara gc5].', Protein database[online], [retrieved on 2013-07-12], National Center for Biotechnology Information, 2012.12.14, Retrieved from the Internet: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/429859358 >	1-9
P,A	WO 2013/065623 A1 (Toyobo Co., Ltd.), 10 May 2013 (10.05.2013), examples 1 to 7 (Family: none)	1-9
P,A	WO 2013/051682 A1 (Toyobo Co., Ltd.), 11 April 2013 (11.04.2013), examples 1 to 7 (Family: none)	1-9
P,A	WO 2013/022074 A1 (Toyobo Co., Ltd.), 14 February 2013 (14.02.2013), examples 1 to 6 (Family: none)	1-9

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

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

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)

GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, Cplus/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS(STN),
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

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	ZAFAR, M. N., et al., 'Electron-Transfer Studies with a New Flavin Adenine Dinucleotide Dependent Glucose Dehydrogenase and Osmium Polymers of Different Redox Potentials', Analytical Chemistry, 2011.12.05, Vol. 84, pp.334-341	1-9

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

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

の日の後に公表された文献

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

国際調査を完了した日

1 2 . 0 7 . 2 0 1 3

国際調査報告の発送日

2 3 . 0 7 . 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)

高山 敏充

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

4 B

4 1 5 3

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	SYGMUND, C., et al., 'Heterologous overexpression of Glomerella cingulata FAD-dependent glucose dehydrogenase in Escherichia coli and Pichia pastoris', Microbial Cell Factories, 2011, Vol. 10, pp.1-6	1-9
A	SYGMUND, C., et al., 'Reduction of quinones and phenoxy radicals by extracellular glucose dehydrogenase from Glomerella cingulata suggests a role in plant pathogenicity', Microbiology, 2011, Vol. 157, pp.3203-3212	1-9
A	WO 2011/068050 A1 (天野エンザイム株式会社) 2011.06.09, 段落【0009】－【0014】 & US 2012/0244565 A1 & EP 2508600 A1	1-9
A	WO 2010/140431 A1 (キッコーマン株式会社) 2010.12.09, 実施例1－3、実施例7 & JP 4648993 B & US 2011/0318810 A1 & EP 2348108 A1	1-9
PX	GAN, P.H.P., et al., Database accession no. ELA34144, 'choline dehydrogenase [Colletotrichum gloeosporioides Nara gc5].', Protein database[online], [retrieved on 2013-07-12], National Center for Biotechnology Information, 2012.12.14, Retrieved from the Internet: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/429859358 >	1-9
PA	WO 2013/065623 A1 (東洋紡株式会社) 2013.05.10, 実施例1－7 (ファミリーなし)	1-9
PA	WO 2013/051682 A1 (東洋紡株式会社) 2013.04.11, 実施例1－7 (ファミリーなし)	1-9
PA	WO 2013/022074 A1 (東洋紡株式会社) 2013.02.14, 実施例1－6 (ファミリーなし)	1-9