

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2013年10月3日(03.10.2013)



(10) 国際公開番号

WO 2013/147206 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/00 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01) C12N 9/04 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) C12Q 1/32 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) C12Q 1/54 (2006.01)

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2013/059639

(22) 国際出願日:

2013年3月29日(29.03.2013)

(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 2012-079835 2012年3月30日(30.03.2012) JP

(71) 出願人: 池田食研株式会社 (IKEDA FOOD RE-SEARCH CO., LTD.) [JP/JP]; 〒7210956 広島県福山市箕沖町95番地7 Hiroshima (JP).

(72) 発明者: 本田 通済 (HONDA Michinari); 〒7210956 広島県福山市箕沖町95番地7 池田食研株式

会社内 Hiroshima (JP). 竹中 涼 (TAKENAKA Ryo); 〒7210956 広島県福山市箕沖町95番地7 池田食研株式会社内 Hiroshima (JP). 宅見 高史 (TAKUMI Takafumi); 〒7210956 広島県福山市箕沖町95番地7 池田食研株式会社内 Hiroshima (JP).

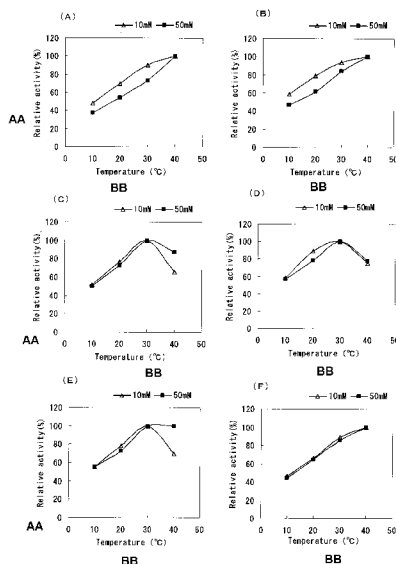
(74) 代理人: 阿部 正博 (ABE Masahiro); 〒2740825 千葉県船橋市前原西二丁目14番地2号 安田ビル10階 千葉ユナイテッド特許事務所内 Chiba (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

[続葉有]

(54) Title: FLAVIN-BINDING GLUCOSE DEHYDROGENASE AND POLYNUCLEOTIDE ENCODING SAME

(54) 発明の名称: フラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼ及びこれをコードするポリヌクレオチド



AA Relative activity (%)
BB Temperature (°C)

(57) Abstract: The purpose of the invention is to provide flavin-binding glucose dehydrogenase having little variation in activity in the typical biosensor measurement temperature range (10-40°C) and a method for measuring glucose using same. The present invention relates to flavin-binding glucose dehydrogenase having the following properties (1)-(3) and the like: (1) action: shows glucose dehydrogenase activity in the presence of an electron acceptor; (2) substrate specificity: the activity value is 10% or less relative to maltose, D-galactose, D-fructose, sorbitol, lactose, and sucrose when the activity value relative to D-glucose is taken to be 100%; and (3) temperature characteristics: the range of the activity value at 10-40°C is 20-150% when the activity value at 30°C is taken to be 100%.

(57) 要約: 本発明の目的は、一般的なバイオセンサの測定温度域 (10~40°C) において、活性の変動が小さいフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼ及びそれを用いるグルコースの測定法を提供すること。本発明は、下記の性質 (1)~(3) を有するフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼなどに関する: (1) 作用: 電子受容体存在下でグルコースデヒドロゲナーゼ活性を示す; (2) 基質特異性: D-グルコースに対する活性値を100%とした場合のマルトース、D-ガラクトース、D-フルクトース、ソルビトール、ラクトース及びスクロースに対する活性値が10%以下である; (3) 温度特性: 30°Cにおける活性値を100%とした場合に、10~40°Cにおける活性値の範囲が20~150%。

WO 2013/147206 A1



SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロ
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),

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：

フラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼ及びこれをコードするポリヌクレオチド

技術分野

[0001] 本発明は、グルコースの1位の水酸基を脱水素（酸化）する反応を触媒する、可溶性のフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼ（GLD）等に関する。より具体的には、新規なGLDポリペプチド、これをコードするポリヌクレオチド、該GLDの製造方法、該GLDを使用することを特徴とするグルコースの測定方法、グルコース測定試薬組成物及びグルコース測定用のバイオセンサ等に関する。

背景技術

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

[0003] そのようなバイオセンサに使用可能な酵素として、酸素を電子受容体とするグルコースオキシダーゼが知られている。しかし、グルコースオキシダーゼは、血中の溶存酸素により測定誤差が生じるという問題があるため、酸素を電子受容体としない、いくつかのグルコースデヒドロゲナーゼが開発されてきた。グルコースデヒドロゲナーゼのうち、フラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼは、補酵素の添加を必要としないこと及び溶存酸素の影響を受けないことから、グルコースバイオセンサ用の酵素として注目されている（特許文献1～7）。これらのフラビン結合型デヒドロゲナーゼの中には、基質特異性に優れるもの（特許文献5）、50℃における活性値を100%とする場合に、10℃における活性値が15%以上、20℃における活性値

が30%以上、60℃における活性値が70%以上であるもの（特許文献6）、アスペルギルス・オリゼ由来のフラビン依存性グルコースデヒドロゲナーゼの組換え大腸菌の細胞破碎液で、37℃における活性値を100%とする場合に25℃における相対的な活性値が改善された改変型酵素（特許文献7）等がある。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開2007-289148号公報

特許文献2：国際公開2007/139013号パンフレット

特許文献3：国際公開2008/001903号パンフレット

特許文献4：国際公開2004/058958号パンフレット

特許文献5：国際公開2010/140431号パンフレット

特許文献6：特開2010-057427号公報

特許文献7：国際公開2011/034108号パンフレット

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] しかしながら、これら従来のグルコースデヒドロゲナーゼの活性は、高温側では反応性が強いが低温側で反応性が低下するものなど、温度帯によって活性の変動が大きかった。そのため、バイオセンサ自体に温度補正機能が付加されているものの、糖尿病患者が血糖値を測定する際に、環境温度によって得られる値が変動する可能性があったため、広い温度帯でより活性の変動が小さい酵素が求められていた。

従って、本発明の課題は、一般的なバイオセンサの測定温度域（10～40℃）において、活性の変動が小さいフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼ及びそれを用いるグルコースの測定法等を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0006] そこで本発明は、種々の微生物由来のグルコースデヒドロゲナーゼを探索

したところ、糸状菌由来のグルコースデヒドロゲナーゼの中に、グルコースに対する基質特異性が高く、且つ30℃における活性値を100%とした場合に、10～40℃における活性値が20～150%であるフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼが存在し、これを用いればより広い温度域で正確且つ再現性良く、グルコース濃度が測定できることを見出し、本発明を完成した。

[0007] すなわち、本発明は、以下の[1]～[14]の態様に関する。

[1] 下記の性質(1)～(3)を有するフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼ：

- (1) 作用：電子受容体存在下でグルコースデヒドロゲナーゼ活性を示す；
- (2) 基質特異性：D-グルコースに対する活性値を100%とした場合のマルトース、D-ガラクトース、D-フルクトース、ソルビトール、ラクトース及びスクロースに対する活性値が10%以下である；
- (3) 温度特性：30℃における活性値を100%とした場合に、10～40℃における活性値が20～150%である。

[2] 酵素タンパクのポリペプチドの分子量が60～70kDaである[1]記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。

[3] 至適温度が30～40℃である[1]又は[2]に記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。

[4] 糸状菌由来である[1]～[3]の何れかに記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。

[5] クロイボタケ綱(Dothideomycetes)に属する糸状菌由来である[1]～[4]の何れかに記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。

[6] 糸状菌に属するグルコースデヒドロゲナーゼ生産菌を培養し、培養物からグルコースデヒドロゲナーゼを採取することを特徴とする[1]～[5]の何れかに記載のグルコースデヒドロゲナーゼの製造方法。

[7] 以下の(a)、(b)又は(c)のタンパク質からなるグルコースデヒドロゲナーゼ：

(a) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18 又は 20 に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質、

(b) 配列番号 2 の 17～591 番目、配列番号 4 の 16～589 番目、配列番号 6 の 24～592 番目、配列番号 8 の 17～591 番目、配列番号 10 の 18～586 番目、配列番号 12 の 18～586 番目、配列番号 14 の 18～586 番目、配列番号 16 の 18～586 番目、配列番号 18 の 18～586 番目又は配列番号 20 の 18～586 番目に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質、

(c) (a) 又は (b) のアミノ酸配列と少なくとも 90% の類似性を有するアミノ酸配列を有し、グルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質。

[8] 以下の (e)、(f)、(g) 又は (h) からなるポリヌクレオチド：

(e) 配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17 又は 19 に示される塩基配列を有するポリヌクレオチド、

(f) 配列番号 1 の 49～1773 番目、配列番号 3 の 46～1767 番目、配列番号 5 の 70～1776 番目又は配列番号 7 の 49～1773 番目、配列番号 9 の 52～1758 番目、配列番号 11 の 52～1758 番目、配列番号 13 の 52～1758 番目、配列番号 15 の 52～1758 番目、配列番号 17 の 52～1758 番目又は配列番号 19 の 52～1758 番目に示される塩基配列を有するポリヌクレオチド、

(g) (e) 又は (f) のポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド、

(h) (a) ～ (c) に記載のタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

[9] [8] に記載のポリヌクレオチドを含む組換えベクター。

[10] [8] に記載のポリヌクレオチドを含む形質転換細胞。

[11] [10] に記載の細胞を培養し、培養物からグルコースデヒドロゲ

ナーゼを採取することを特徴とするグルコースデヒドロゲナーゼの製造方法。

[12] [1]～[5]若しくは[7]の何れかに記載のグルコースデヒドロゲナーゼ又は[6]若しくは[11]に記載の方法で製造されたグルコースデヒドロゲナーゼを使用するグルコースの測定方法。

[13] [1]～[5]若しくは[7]の何れかに記載のグルコースデヒドロゲナーゼ又は[6]若しくは[11]に記載の方法で製造されたグルコースデヒドロゲナーゼを含有するグルコース測定試薬。

[14] [1]～[5]若しくは[7]の何れかに記載のグルコースデヒドロゲナーゼ又は[6]若しくは[11]に記載の方法で製造されたグルコースデヒドロゲナーゼを使用するグルコース測定用バイオセンサ。

発明の効果

[0008] 本発明によって一般的なバイオセンサの測定温度域（10～40℃）において、活性の変動が小さいフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼを提供することが出来、該酵素を用いれば、測定環境が低温であっても正確且つ再現性良く、血中グルコースを測定することができる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]本発明グルコースデヒドロゲナーゼ（A）～（F）のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を示す図である。

[図2]本発明グルコースデヒドロゲナーゼ（A）～（F）の至適温度の範囲を示す図である。

[図3]本発明グルコースデヒドロゲナーゼ（A）～（F）によるグルコース量測定結果を示す図である。

[図4]本発明グルコースデヒドロゲナーゼ（F）のpH安定性を示す図である。

発明を実施するための形態

[0010] 本発明のグルコースデヒドロゲナーゼは、可溶性のフラビン結合型のグルコースデヒドロゲナーゼであり、補酵素としてのフラビンが結合した状態で

活性を示す酵素である。例えば、EC 1. 1. 99. 10に分類される酵素である。ここでフラビンとしては、フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD)、フラビンモノヌクレオチド (FMN) が挙げられる。

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

[0012] (1) 作用：電子受容体存在下でグルコースデヒドロゲナーゼ活性を示す。

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

(3) 温度特性：30℃における活性値を100%とした場合に、10~40℃における活性値が20~150%である。

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

[0014] 本発明のグルコースデヒドロゲナーゼの基質特異性は、D-グルコースに対する特異性が高いため、グルコースの測定に適している。本発明のグルコースデヒドロゲナーゼは、(2) D-グルコースに対する反応性に対してD-グルコースに対する活性値を100%とした場合のマルトース、D-ガラクトース、D-フルクトース、ソルビトール、ラクトース及びスクロースに対する反応性が低く、10%以下であり、好ましくは8%以下、より好ましくは6%以下、更に好ましくは5%以下である。更に好ましくはD-グルコ

ースに対する活性値を100%とした場合のD-フルクトース、ソルビトール、ラクトース及びスクロースに対する活性値は1%以下であって、特に好ましくは0.5%以下である。

[0015] 本発明のグルコースデヒドロゲナーゼの温度特性は、(3) 30℃における活性値を100%とした場合に、10～40℃における活性値は20～150%であって、当該10℃～40℃における活性値の下限値は30%であるのが好ましく、40%であるのがより好ましく、50%であるのが更に好ましい。更に、当該10～40℃における活性値の上限値は140%であるのが好ましく、130%であるのがより好ましく、120%であるのが更に好ましく、110%であるのが特に好ましい。

即ち、好適範囲は、基質濃度10mMの場合、好ましくは30～130%、より好ましくは40～120%、更に好ましくは50～110%；基質濃度50mMの場合、好ましくは30～140%、より好ましくは40～130%、更に好ましくは50～120%である。

又は、30℃における活性値を100%とした場合に、10℃における活性値が20%以上であるのが好ましく、基質濃度10mMの場合、より好ましくは30%以上、更に好ましくは40%以上、特に好ましくは50%以上；基質濃度50mMの場合、より好ましくは30%以上、更に好ましくは40%以上、特に好ましくは50%以上である。

又は、30℃における活性値を100%とした場合に、20℃における活性値が40%以上であるのが好ましく、基質濃度10mMの場合、より好ましくは50%以上、更に好ましくは60%以上、特に好ましくは70%以上；基質濃度50mMの場合、より好ましくは50%以上、更に好ましくは60%以上、特に好ましくは70%以上である。

[0016] 本発明のグルコースデヒドロゲナーゼは、更に以下の(4)～(6)の性質を有していることが好ましい。即ち、(4) 酵素タンパクのポリペプチドの分子量が60～70kDaであるのが好ましく、65～70kDaであるのがより好ましい。酵素タンパクのポリペプチドの分子量とは、糖鎖を除去

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

[0017] 本発明のグルコースデヒドロゲナーゼの(5)至適温度は、30～40℃であるのが好ましい。より詳細には、該酵素を、各種温度で、後述の酵素活性測定法により測定し、該酵素が最大活性を示す温度における活性値を100%とした場合に、30～40℃で相対活性値が50%以上であるのがより好ましく、60%以上であるのが更に好ましく、80℃以上であるのが最も好ましい。

[0018] 本発明のグルコースデヒドロゲナーゼの(6) Kmは、1～80 mMであるのが好ましく、5～60 mMであるのがより好ましい。

[0019] 本発明のグルコースデヒドロゲナーゼの具体例としては、後記実施例2～7に示すような6種を挙げられる。

[0020] 本発明のグルコースデヒドロゲナーゼの由来は特に制限されないが、糸状菌であるのが好ましく、より好ましくはクロイボタケ綱(Dothideomycetes)に属する糸状菌であり、より好ましくはクロイボタケ亜綱(Dothideomycetidae)又はプレオスポラ菌亜綱(Pleosporomycetidae)に属する糸状菌であり、より好ましくはクロイボタケ目(Dothideales)、カプノディウム目(Capn odiales)又はプレオスポラ目(Pleosporales)に属する糸状菌であり、更に好ましくはドチオラ科(Dothioraceae)、ダビディエラ科(Davidiellaceae)又はベンツリア科(Venturiaceae)に属する糸状菌であり、特に好ましくはアウレオバシジウム(Aureobasidium)属、カバティエラ(Kabat iella)属、クラドスポリウム(Cladosporium)属又はフシクラディウム属の何れかに属する糸状菌であり、最も好ましくはアウレオ

バシジウム・プルランス (*Aureobasidium pullulans*)、カバティエラ・カウリボラ (*KabatIELla caulivora*)、カバティエラ・ゼアエ (*KabatIELla zeae*)、クラドスポリウム・エスピー (*Cladosporium sp.*) クラドスポリウム・クラドスポリオイデス (*Cladosporium cladosporioides*)、クラドスポリウム・フニクロサム (*Cladosporium funiculosum*)、クラドスポリウム・オキシスポラム (*Cladosporium oxysporum*)、クラドスポリウム・デリカツラム (*Cladosporium delicatulum*)、クラドスポリウム・ゴッシピーコラ (*Cladosporium gossypicola*)、クラドスポリウム・テヌイッシマム (*Cladosporium tenuissimum*) 又はフシクラディウム・カルポフィラム (*Fusicladium carpophilum*) から選ばれる糸状菌である。具体的には、本明細書の実施例 1～11 に記載された 10 種類の菌株を挙げることができる。

[0021] 本発明のグルコースデヒドロゲナーゼは、例えば、糸状菌に属するグルコースデヒドロゲナーゼ生産菌を培養し、培養物から採取することにより製造することができる。

[0022] 本発明で使用される微生物の培養には、通常微生物培養用培地が使用でき、炭素源、窒素源、無機物その他使用微生物が必要とする微量栄養素を程よく含有するものであれば、合成培地、天然培地の何れでも使用可能である。炭素源としては、グルコース、スクロース、デキストリン、澱粉、グリセリン、糖蜜などが使用できる。窒素源としては、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウムなどの無機塩類、DL-アラニン、L-グルタミン酸などのアミノ酸類、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、麦芽エキス、コーンステープリカーなどの窒素含有天然物が使用できる。無機物としては、リン酸一ナトリウム、リン酸二ナトリウム、リン酸一カリウム、リン酸二カリウム、硫酸マグネシウム、塩化第二鉄などが

使用できる。

[0023] 本発明のグルコースデヒドロゲナーゼを得るための培養は、通常、振盪培養や通気攪拌などの方法による好氣的条件下で行うのがよく、20℃から50℃、且つpH4からpH8の範囲で行うのが好ましい。培養期間は2日から10日の範囲が好ましい。この様な方法で培養することにより、培養物中、特に培養液中にグルコースデヒドロゲナーゼを生成蓄積することができる。又は該培養方法により、培養微生物内にもグルコースデヒドロゲナーゼを生成蓄積することができる。ついで、培養物中からグルコースデヒドロゲナーゼを得る方法は、通常のタンパク質の精製方法が使用できる。この方法は、例えば、微生物を培養後、遠心分離などにより微生物を除き培養上清を得る方法、又は微生物を培養後、培養液を遠心分離して培養微生物を得、適当な方法で該培養微生物を破碎し、破碎液から遠心分離などによって上清液を得る方法である。これらの上清液中に含まれるグルコースデヒドロゲナーゼは、限外ろ過、塩析、溶媒沈殿、透析、イオン交換クロマトグラフィー、疎水吸着クロマトグラフィー、ゲルろ過、アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動などの適当な精製操作を組み合わせることによって精製できる。

[0024] 更に、本発明のグルコースデヒドロゲナーゼを得るための培養は、固体培地も使用できる。培養方法には特に制限はなく、静置培養によってもよく、培養物を常時混合するような回転培養や流動層培養などによっても行うことができるが、設備投資の少ない培養装置としては静置培養が好ましい。次いで、培養物中からグルコースデヒドロゲナーゼを得る方法は、通常のタンパク質の精製方法が使用できる。すなわち、培養物に水などの抽出剤を加えて攪拌したのち、ふすまなどの培地固形分を遠心分離、ろ過などの分離法により除去して抽出液を得ることにより行うことができる。一方、菌体内に蓄積されたグルコースデヒドロゲナーゼの回収は、上記の抽出液を得た培養物残渣を海砂などの研磨剤とともに磨砕したのち、水などを加えて、菌体から遊離されたグルコースデヒドロゲナーゼを抽出する方法などで行うことができる。又は、全グルコースデヒドロゲナーゼを得るには、培養物全体を海砂な

どの研磨剤とともに磨砕したのち、水などを加えて、菌体から遊離されたグルコースデヒドロゲナーゼと培地中に分泌されたグルコースデヒドロゲナーゼの両方を一挙に抽出する方法などで行うことができる。これらの上清液中に含まれるグルコースデヒドロゲナーゼは、限外ろ過、塩析、溶媒沈殿、透析、イオン交換クロマトグラフィー、疎水吸着クロマトグラフィー、ゲルろ過、アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動などの適当な精製操作を組み合わせることによって精製できる。

[0025] 本発明のグルコースデヒドロゲナーゼは、合成によるグルコースデヒドロゲナーゼや遺伝子工学によって得られた組換え型のグルコースデヒドロゲナーゼであってもよい。当業者は本発明の開示に基づいて容易にこのような組換え型のグルコースデヒドロゲナーゼを得ることができる。例えば、本発明のグルコースデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列及びそれをコードする遺伝子の塩基配列をもとに合成法によって得ることができるし、該グルコースデヒドロゲナーゼ遺伝子の遺伝子断片を市販の発現ベクターなど公知の発現ベクターに挿入し、得られたプラスミドを使用して大腸菌や糸状菌などの宿主を形質転換し、形質転換体を培養して目的のグルコースデヒドロゲナーゼを得るといった遺伝子工学によって該グルコースデヒドロゲナーゼを工業的に製造することも可能である。

[0026] 本発明のグルコースデヒドロゲナーゼは、(a)、(b)、(c)又は(d)のタンパク質からなるグルコースデヒドロゲナーゼである。

(a) 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18又は20に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質。

(b) 配列番号2の17～591、配列番号4の16～589、配列番号6の17～592、配列番号8の17～591、配列番号10の12～586、配列番号12の12～586、配列番号14の12～586、配列番号16の12～586、配列番号18の12～586、配列番号20の12～586、配列番号2の24～591、配列番号4の23～589、配列番号6の24～592、配列番号8の24～591、配列番号10の18～586

、配列番号 12 の 18～586、配列番号 14 の 18～586、配列番号 16 の 18～586、配列番号 18 の 18～586 又は配列番号 20 の 18～586 に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質。

(c) (a) 又は (b) のアミノ酸配列と少なくとも 90%、好ましくは少なくとも 95% の類似性を有するアミノ酸配列を有し、グルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質。

類似性は、GENETYX (ソフトウェア開発株式会社製) のアミノ酸配列同士のホモロジー解析により算出された *Similarity* の値に基づく。

(d) (a) 又は (b) のアミノ酸配列と少なくとも 60%、好ましくは少なくとも 65%、70%、75%、80%、85%、90% 又は 95% の同一性を有するアミノ酸配列を有し、グルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質。

同一性は、GENETYX (ソフトウェア開発株式会社製) のアミノ酸配列同士のホモロジー解析により算出された *identity* の値に基づく。

(a) ～ (d) のタンパク質は何れも好ましくは上記の性質 (1) ～ (3) を有するフラビン結合型のグルコースデヒドロゲナーゼであり、更に好ましくは性質 (4) ～ (6) を有する。

各アミノ酸配列の内、シグナル配列は、配列番号 2 の 1～16 番目、配列番号 6 の 1～23 番目及び配列番号 12 の 1～11 番目のアミノ酸配列である。配列番号 2、6 又は 12 のシグナル配列から、配列番号 4 の 1～15 番目、1～22 番目、配列番号 8 の 1～16 番目、1～23 番目、又は配列番号 10、14、16、18 若しくは 20 の 1～11 番目のアミノ酸配列が、シグナル配列と予測される。

尚、組換え株由来成熟タンパクは本明細書に記載の野生株由来酵素 (成熟タンパク) の N 末端から、数アミノ酸が置換、付加若しくは欠失した改変アミノ酸配列からなるタンパク質でも良い。即ち、組換え株由来成熟タンパクは、野生株由来成熟タンパクの N 末端に於いて、1～25、20 以下、10

以下、9以下、8以下、7以下若しくは6以下のアミノ酸が付加又は置換されていてもよく、又は1～10、9以下、8以下、7以下若しくは6以下のアミノ酸が欠失していても上記のグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有し得る。

[0027] 本発明のポリヌクレオチドは、(e)、(f)、(g)、(h)又は(i)を含むポリヌクレオチドである。

(e) 配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17又は19に示される塩基配列を有するポリヌクレオチド。

(f) 配列番号1の49～1773番目、配列番号3の46～1767番目、配列番号5の49～1776番目、配列番号7の49～1773番目、配列番号9の34～1758番目、配列番号11の34～1758番目、配列番号13の34～1758番目、配列番号15の34～1758番目、配列番号17の34～1758番目、配列番号19の34～1758番目、配列番号1の70～1773番目、配列番号3の67～1767番目、配列番号5の70～1776番目、配列番号7の70～1773番目、配列番号9の52～1758番目、配列番号11の52～1758番目、配列番号13の52～1758番目、配列番号15の52～1758番目、配列番号17の52～1758番目又は配列番号19の52～1758番目に示される塩基配列を有するポリヌクレオチド。

(g) (e)又は(f)のポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

(h) (a)～(d)に記載のタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

(i) (e)又は(f)のポリヌクレオチドと少なくとも60%、好ましくは少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%の同一性を有し、且つグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

同一性は、GENETYX（ソフトウェア開発株式会社製）の塩基配列同

土のホモロジー解析により算出された *i d e n t i t y* の値に基づく。

(e) ~ (i) のポリヌクレオチドは何れも上記のグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードする。

尚、各ポリヌクレオチドの内、シグナル配列をコードするのは、配列番号1の1~48番目、配列番号5の1~69番目、配列番号11の1~33番目の塩基配列である。配列番号1、5又は11のシグナル配列をコードする塩基配列から、配列番号3の1~45番目、1~66番目、配列番号7の1~48番目、1~69番目、又は配列番号9、13、15、17若しくは19の1~33番目に示される塩基配列と予測される。

更に、上記のような野生株由来酵素（成熟タンパク）のN末端から、数アミノ酸が置換、付加若しくは欠失した改変アミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチドも利用できる。

[0028] アミノ酸配列及び塩基配列の同一性パーセンテージは、基準配列（本発明では（a）、（b）、（e）又は（f）の配列）を照会配列として、比較するアルゴリズムをもった公開又は市販されているソフトウェアを用いて計算することができる。例として、BLAST、FASTA又はGENETYX（ソフトウェア開発株式会社製）若しくはGeneDocなどを用いることができ、これらはデフォルトパラメーターで使用するすることができる。

[0029] 本発明において、ハイブリダイズに際しての「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズ」の具体的な条件とは、例えば、50%ホルムアミド、5×SSC（150mM 塩化ナトリウム、15mM クエン酸三ナトリウム、10mM リン酸ナトリウム、1mM エチレンジアミン四酢酸、pH 7.2）、5×デンハート（Denhardt's）溶液、0.1% SDS、10% デキストラン硫酸及び100μg/mLの変性サケ精子DNAで42℃インキュベーションした後、フィルターを0.2×SSC中42℃で洗浄することを例示することができる。

[0030] 本発明のポリヌクレオチドのシグナル配列は、前記に記載の通りだが、例えば国際公開2006/101239に記載のアスペルギルス・テレウス由

来グルコース脱水素酵素配列のシグナル配列（該公報の配列番号2の1～19に示されるアミノ酸配列）と比較することや、シグナル配列予測サイト（Signal P: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>）を用いても推定できる。推定されたシグナル配列を削除したアミノ酸配列からなるタンパク質であっても、グルコースデヒドロゲナーゼ活性を有すると考えられる。

[0031] 尚、本発明において、「ポリヌクレオチド」とは、具体的にはフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼをコードする合成DNA、染色体DNA、mRNAから合成されたcDNA又はそれらを鋳型としてPCR増幅して得たポリヌクレオチドを含む。「ポリペプチド」とは、アミノ酸がペプチド結合によって連なった化合物で、細胞中のリボソームで合成又は人工的に合成された分子を意味し、更には、これらに糖鎖が付加したものや、人工的に化学的修飾がなされたもの等も含む。

[0032] 染色体DNA又はRNAの由来は特に制限されないが、糸状菌であるのが好ましく、より好ましくはクロイボタケ綱に属する糸状菌であり、より好ましくはクロイボタケ亜綱又はプレオスポラ亜綱に属する糸状菌であり、より好ましくはクロイボタケ目、カプノディウム目又はプレオスポラ目に属する糸状菌であり、更に好ましくはドチオラ科、ダビディエラ科又はベンツリア科に属する糸状菌であり、特に好ましくはアウレオバシジウム属、カバティエラ属、クラドスポリウム属又はフシクラディウム属に属する糸状菌であり、最も好ましくはアウレオバシジウム・プルランス、カバティエラ・カウリボラ、カバティエラ・ゼアエ、クラドスポリウム・エスピー（*Cladosporium* sp）、クラドスポリウム・クラドスポリオイデス、クラドスポリウム・フニクロサム、クラドスポリウム・オキシスポラム、クラドスポリウム・デリカツラム、クラドスポリウム・ゴッシピーコラ、クラドスポリウム・テヌイッシマム又はフシクラディウム・カルポフィラムである。前記糸状菌から染色体DNA又はRNAを抽出し、DNA又はcDNAライブラリーを調製することができる。続いて、公知のフラビン結合型グルコース

デヒドロゲナーゼをコードするDNA、例えば国際公開2006/101239に記載のアスペルギルス・テレウス由来のフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼをコードするDNA、特許文献3記載のアスペルギルス・オリゼ由来のフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼをコードするDNA及び／又は配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17及び19の同一性を比較したアライメントに基づいて、複数のオリゴヌクレオチドプローブ又は縮重プライマーを作製する。又は、DNAを適当な制限酵素で切断してプローブ又はプライマーを作製してもよい。前記のプローブ又はプライマーを用いてハイブリダイズ、PCR、RT-PCR等、常法によって上記ライブラリーから、本願のポリヌクレオチドを取得することができる。

[0033] 具体的には、前記アライメントの内、同一性の高い部位から内部配列解読用のフォワードプライマー及びリバースプライマーを作製し、上記ライブラリーを鋳型としてPCRを行う。フォワードプライマーは、好ましくは増幅側（下流側）が少なくとも2塩基一致する部位で、好ましくは15～40塩基程度の配列長に設計できる部位で、配列番号1の238～260番目及び394～417番目の部位が例示できる。リバースプライマーは、好ましくは増幅側（上流側）が少なくとも2塩基一致する部位で、好ましくは15～40塩基程度の配列長に設計できる部位で、配列番号1の1600～1625番目、1735～1757番目の部位が例示できる。この部位から設計したプライマーを用いてPCRを行う際、アニーリング温度は低く設定し、40～50℃が好ましく、40～45℃がより好ましい。1段階目で使用したプライマーセットの内側のプライマーセットを用いて2段階目のPCRを行っても良い。プライマーに利用した塩基の位置からPCR産物のサイズを予想し、該当するPCR産物を解読する。解読したPCR産物が配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17又は19の該当箇所と少なくとも50%の同一性、好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、更に好ましくは少なくとも90%、特に好ましくは少なくとも95%の同一性があれば、本願遺伝子の内部配列を取得できている。次に

解読した内部配列から、周知の方法で本発明の遺伝子全長を取得できる。つまり、本発明の遺伝子の開始コドン周辺及び終止コドン周辺を解明するためにプライマーを設計し、該プライマーを用いて、上記ライブラリーを鋳型として5' - R A C E 法及び3' - R A C E 法を行う。その結果、本発明のグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の開始コドン周辺及び終止コドン周辺が解明できる。続いて本発明のグルコースデヒドロゲナーゼをコードする開始コドンから終止コドンまでの全長遺伝子を増幅できるプライマーを設計し、該プライマーを用いて、上記ライブラリーを鋳型として本発明のポリヌクレオチドを取得することができる。

[0034] 本発明のポリヌクレオチドは、(a)又は(b)のアミノ酸配列を用いて、機能未知の公開配列に対して例えばB L A S T (b l a s t p又はt b l a s t n)等のホモロジー検索を行い、同一性が少なくとも55%、好ましくは少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%の同一性でヒットした550~650アミノ酸配列長であるアミノ酸配列をコードする遺伝子配列から取得することができる。公開配列から全長を取得できるプライマーをデザインし、該遺伝子配列の由来株のDNA又はRNAを鋳型としてPCR又はRT-PCRにより増幅して得ることができる。更に増幅して得た該ポリヌクレオチドを用いて常法により組換えタンパク質を得て、グルコースデヒドロゲナーゼ活性を確認することができる。DNA又はRNAは、該遺伝子配列の由来株と同種又は同属の株からも得ることができる。

[0035] 本発明のポリヌクレオチドは、公知のミューテーション導入法や変異導入PCR法等によって改変して作製することができる。更に、染色体DNAやそのcDNAライブラリーから、ヌクレオチド配列情報に基づいて作製したオリゴヌクレオチドを用いるプローブハイブリダイゼーション法によって取得することができる。ハイブリダイゼーションに際して、ストリンジェント条件を様々に変化させることによって、上記ポリヌクレオチドを取得することができる。ストリンジェント条件は、ハイブリダイゼーション及び洗浄工

程における塩濃度、有機溶媒（ホルムアルデヒド等）の濃度、温度条件等によって規定され、例えば、米国特許No. 6,100,037号明細書等に開示されているような、当業者らに周知の様々な条件を採用することができる。

[0036] 文献（例えばCarruthers (1982) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47:411-418; Adams (1983) J. Am. Chem. Soc. 105:661; Belousov (1997) Nucleic Acid Res. 25:3440-3444; Frenkel (1995) Free Radic. Biol. Med. 19:373-380; Blommers (1994) Biochemistry 33:7886-7896; Narang (1979) Meth. Enzymol. 68:90; Brown (1979) Meth. Enzymol. 68:109; Beaucage (1981) Tetra. Lett. 22:1859; 米国特許第4,458,066号）に記載されているような周知の化学合成技術により、*in vitro*において本発明のポリヌクレオチドを合成することができる。

[0037] 本発明の組換えベクターは、クローニングベクター又は発現ベクターであり、インサートとしてのポリヌクレオチドの種類や、その使用目的等に応じて適宜のものを使用する。例えば、cDNA又はそのORF領域をインサートとしてフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼを生産する場合には、*in vitro*転写用の発現ベクターや、大腸菌、枯草菌等の原核細胞、酵母、カビなどの糸状菌、昆虫細胞、哺乳動物細胞等の真核細胞のそれぞれに適した発現ベクターを使用することもできる。宿主に対応して、同一アミノ酸配列であるが、コドンユーセージを最適化したポリヌクレオチドを導入しても良い。更に糖鎖の要、不要、その他のペプチド修飾の必要性に応じて、適宜宿主は選択することができるが、糖鎖付加可能な宿主を選択し、糖鎖を有する酵素を製造することが好ましい。

[0038] 本発明の形質転換細胞としては、例えば、大腸菌、枯草菌等の原核細胞や

、酵母、カビ、昆虫細胞、哺乳動物細胞等の真核細胞等を使用することができる。カビは特に限定されないが、好ましくはチャワタケ亜門（*Pezizomycotina*）、より好ましくはクロイボタケ綱（*Dothideomycetes*）、ユーロチウム菌綱（*Eurotiomycetes*）、ズキンタケ綱（*Leotiomycetes*）又はフタマカビ綱（*Sordariomycetes*）、更に好ましくはユーロチウム目、特に好ましくはアスペルギルス属に属する菌を使用する。これらの形質転換細胞は、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リボソーム法、DEAEデキストラン法など公知の方法によって組換えベクターを細胞に導入することによって調製することができる。組換えベクター及び形質転換細胞の具体例として、下記実施例に示した組換えベクターと、このベクターによる形質転換大腸菌及び形質転換カビが挙げられる。

[0039] 本発明のフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼを大腸菌などの微生物でDNAを発現させて生産させる場合には、微生物中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、DNAクローニング部位、ターミネーター配列等を有する発現ベクターに前記のポリヌクレオチドを組換えた発現ベクターを作製し、この発現ベクターで宿主細胞を形質転換したのち、得られた形質転換体を培養すれば、フラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼを微生物で大量生産することができる。この際、任意の翻訳領域の前後に開始コドンと終止コドンを付加して発現させれば、任意の領域を含むフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼ断片を得ることもできる。特に、分泌シグナル配列をコードする遺伝子配列を含む外来遺伝子を用いて、大腸菌などのグラム陰性菌で組換えタンパクを発現させる場合は、組換えタンパクがペリプラズムに移行されるため、生産性が悪い。そのため、組換えタンパクを効率よく回収したい場合は、シグナル配列をコードする遺伝子配列を削除した配列を用いるのが良い。又は、他の蛋白質との融合蛋白質として発現させることもできる。原核細胞で発現させて生産させる場合は、イントロンを含まないグルコースデヒドロゲナーゼ遺伝子を挿入する必要があり、特に

グラム陰性菌の場合、イントロンを含まずシグナル配列をコードする配列を含まないポリヌクレオチド、例えば（f）に記載のポリヌクレオチドに開始コドンA T Gを付加したポリヌクレオチドを挿入することが好ましい。グラム陽性菌の場合、シグナル配列をコードする配列を含むポリヌクレオチドであっても良く、シグナル配列をコードする配列を含まないポリヌクレオチド、例えば（f）に記載のポリヌクレオチドに開始コドンA T Gを付加したポリヌクレオチドであってもよく、シグナル配列をコードする配列を宿主に適切な配列に置換したポリヌクレオチドを挿入しても良い。終止コドンを宿主に最適な終止コドンに置換することで組換えタンパクの発現量を向上させても良い。大腸菌用発現ベクターとしては、p U C系、p B l u e s c r i p t I I、p E T発現システム、p G E X発現システム、p C o l d発現システムなどが例示できる。

[0040] 一方、フラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼを真核細胞で発現させて生産させる場合には、前記ポリヌクレオチドを、プロモーター、スプライシング領域、ポリ（A）付加部位等を有する真核細胞用発現ベクターに挿入して組換えベクターを作製し、真核細胞内に導入すれば、フラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼを真核細胞で生産することができる。プラスミドのような状態で細胞内に維持することもできるし、染色体中に組みこませて維持することもできる。挿入するポリヌクレオチドは、シグナル配列をコードする配列を含むポリヌクレオチドであっても良く、シグナル配列をコードする配列を含まないポリヌクレオチド、例えば（f）に記載のポリヌクレオチドに開始コドンA T Gを付加したポリヌクレオチドであってもよく、シグナル配列をコードする配列を例えば宿主に適切なシグナル配列に置換したポリヌクレオチドでも良い。終止コドンを宿主に最適な終止コドンに置換することで組換えタンパクの発現量を向上させても良い。発現ベクターとしては、p K A 1、p C D M 8、p S V K 3、p S V L、p B K - C M V、p B K - R S V、E B Vベクター、p R S、p Y E 8 2などが例示できる。更に、p I N D / V 5 - H i s、p F L A G - C M V - 2、p E G F P - N 1、p E G F

P C 1 などを発現ベクターとして用いれば、H i s タグ、F L A G タグ、G F P など各種タグを付加した融合蛋白質としてフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼポリペプチドを発現させることもできる。

[0041] 既に述べたように、本発明のフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼは、本発明のポリヌクレオチド（c D N A 又はその翻訳領域）を有するベクターから *i n v i t r o* 転写によって R N A を調製し、これを鋳型として *i n v i t r o* 翻訳を行うことにより *i n v i t r o* でフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼを作製することができる。

[0042] 本発明のフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼを *i n v i t r o* 発現させて生産させる場合には、前記のポリヌクレオチドを、R N A ポリメラーゼが結合できるプロモーターを有するベクターに挿入して組換えベクターを作製し、このベクターを、プロモーターに対応する R N A ポリメラーゼを含むウサギ網状赤血球溶解物や小麦胚芽抽出物などの *i n v i t r o* 翻訳系に添加すれば、フラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼを *i n v i t r o* で生産することができる。R N A ポリメラーゼが結合できるプロモーターとしては、T 3、T 7、S P 6 などが例示できる。これらのプロモーターを含むベクターとしては、p K A 1、p C D M 8、p T 3 / T 7 1 8、p T 7 / 3 1 9、p B l u e s c r i p t 1 1 などが例示できる。

[0043] 本酵素の活性測定においては、該酵素を、好ましくは終濃度 0. 1 5 - 0. 6 u n i t / m L になるように適宜希釈して用いる。尚、該酵素の酵素活性単位（u n i t）は 1 分間に 1 μ m o l のグルコースを酸化する酵素活性である。本発明のグルコースデヒドロゲナーゼ（G L D）の酵素活性は、次の方法で測定できる。

（酵素活性測定法）

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

1 0 0 m M リン酸カリウム緩衝液（p H 6. 0）1. 0 0 m L、1 M D - グルコース溶液 1. 0 0 m L、超純水 0. 6 1 m L、3 m M 2, 6 - ジクロロ

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

[0044] [数1]

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

[0045] 尚、式中の3.0は反応試薬+酵素溶液の液量（mL）、10.8はpH 6.0におけるDCIPのモル吸光係数（ $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ）、1.0はセルの光路長（cm）、0.05は酵素溶液の液量（mL）、 $\Delta A_{600\text{blank}}$ は酵素の希釈に用いた溶液を酵素溶液の代わりに添加して反応開始した場合の600 nmにおける吸光度の1分間あたりの減少量、dfは希釈倍率を表す。

[0046] 本発明のグルコースデヒドロゲナーゼは、前述のように酸素の影響を受けず、グルコースに対する特異性が高く、且つ室温でも高い活性を維持しているため、グルコース濃度、特に血中グルコース濃度の測定用酵素として有用である。グルコースを含む被検試料、例えば血液と本発明のグルコースデヒドロゲナーゼとを接触させる工程により、被検試料中のグルコースが測定できる。

[0047] 本発明のグルコースデヒドロゲナーゼは、グルコース測定試薬に用いることができる。該測定試薬は、牛血清アルブミン（BSA）若しくは卵白アルブミン、該酵素と作用性のない糖類（例えば、トレハロースなど）若しくは糖アルコール類、カルボキシル基含有化合物、アルカリ土類金属化合物、ア

ンモニウム塩、硫酸塩又はタンパク質等から成る群より選ばれる熱安定化剤、又は緩衝剤等の当業者に公知の他の任意成分を適宜含有させ、該酵素や試薬成分の熱安定性や保存安定性を高めることができる。更に、被験試料中に存在する、測定に影響を与える夾雑物質の影響を抑える公知の物質を、該測定試薬に含ませることができる。

[0048] 本発明のグルコースデヒドロゲナーゼは、バイオセンサに用いることができる。

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

[0049] バイオセンサの電子受容体としては、電子の授受能に優れた物質を用いることができる。電子の授受能に優れた物質とは、一般的に「電子伝達体」、「メディエータ」あるいは「酸化還元媒介剤」と呼ばれる化学物質やタンパク質性の電子メディエータであり、これらに該当する化学物質として、例えば、特表2002-526759に挙げられた電子伝達体や酸化還元媒介剤などを利用してもよい。

[0050] 更に本発明のグルコースデヒドロゲナーゼは、バイオ電池に用いることが

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

実施例

[0051] 以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、本発明はその要旨を超えない限り、以下の実施例によって限定されるものではない。以下の実施例におけるグルコースデヒドロゲナーゼ活性の定量は前記の方法に従って行った。

[0052] [実施例 1]

(本発明のフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼ (GLD) の取得)

(1) GLD 活性の確認

自然界から分離した菌株及び微生物保存機関 (独立行政法人 製品評価技術基盤機構: 〒292-0818 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足 2-5-8) から購入した菌株、計約 3,800 株から GLD 生産菌の探索を行った結果、*Aureobasidium pullulans* S20、*Aureobasidium pullulans* NBRC4464、*Kabatella caulivora* NBRC7314、*Kabatella zea* NBRC9664、*Cladosporium* sp. T799、*Cladosporium* sp. T806、*Cladosporium cladosporioides* NBRC4459、*Cladosporium funiculosum* NBRC6537、*Cladospori*

um oxysporum NBRC32511、及びFusicladium carpophilum NBRC9645の培養上清にGLD活性が確認できた。

[0053] (2) *A. pullulans* S20由来GLDの精製

グルコース1% (ナカライテスク社製) (w/v)、大豆粉2% (昭和産業社製) (w/v)、リン酸二水素カリウム0.5% (ナカライテスク社製) (w/v)、硫酸マグネシウム七水和物0.05% (ナカライテスク社製) (w/v)、ヒドロキノン0.17 g/L (ナカライテスク社製)、キシリジン0.0006% (和光純薬社製) (w/v)、EDTA0.15 mM (和光純薬社製)、ビオチン2 ng/mL (和光純薬社製)、(+)-パントテン酸カルシウム0.4 µg/mL (和光純薬社製)、イノシトール2 µg/mL (和光純薬社製)、ニコチン酸0.4 µg/mL (和光純薬社製)、チアミン塩酸塩0.4 µg/mL (和光純薬社製)、p-アミノベンゾニクアシッド0.2 µg/mL (和光純薬社製)、ビタミンB2 0.2 µg/mL (ナカライテスク社製)、葉酸10 ng/mL (和光純薬社製)、及び水からなる液体培地500 mLを2000 mL容の坂口フラスコに入れ、121°C、20分間オートクレーブした。冷却したこの液体培地に、*A. pullulans* S20株を植菌し、15°Cで14日間振とう培養した。培養終了後、培養液をろ布でろ過し、回収したろ液を遠心して上清を回収し、更にメンブレンフィルター(10 µm、アドバンテック社製)でろ過して培養上清を回収し、分画分子量8,000の限外ろ過膜(ミリポア社製)で濃縮して粗酵素液とした。

[0054] 前記粗酵素液を、60%飽和硫酸アンモニウム溶液に調整し、4°Cで一晩放置後、遠心分離して上清を回収した。

該上清を、60%飽和硫酸アンモニウムを含む50 mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)で予め平衡化したTOYOPEARL Butyl-650C (東ソー社製)カラムに通液して酵素を吸着させた。該カラムを同緩衝液で洗浄した後、同緩衝液から50 mMリン酸カリウム緩衝液(pH 6.

0) へのグラジエント溶出法で酵素を溶出させて、活性画分を回収した。回収した活性画分を、限外濾過膜で濃縮後、脱塩し、10 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) と平衡化させ、同緩衝液で予め平衡化したDEAE-Sephacryl (GEヘルスケア社製) カラムに通液して酵素を吸着させた。該カラムを同緩衝液で洗浄した後、0.2 M塩化ナトリウムを含む、10 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) へのグラジエント溶出法で酵素を溶出させて、活性画分を回収した。回収した活性画分を、限外濾過膜で濃縮後、脱塩し、10 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) と平衡化させ、同緩衝液で予め平行化したmono Q 5/5 (GEヘルスケア社製) カラムに通液して酵素を吸着させた。該カラムを同緩衝液で洗浄した後、1 M塩化ナトリウムを含む10 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) へのグラジエント溶出法で酵素を溶出させて、活性画分を回収した。回収した活性画分を、限外濾過膜で濃縮後、脱塩し、10 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) と平衡化させ、同緩衝液で予め平行化したHiLoad 26/60 Superdex 200 pg (GEヘルスケア社製) に通液し、その後同緩衝液を用いて、ゲル濾過精製を実施し、活性画分を回収した。回収した活性画分を分画分子量8,000の限外ろ過膜で濃縮後、水置換して野生株由来ApsGLDサンプルとした。該精製酵素の比活性は378 U/mgだった。

[0055] [実施例2]

(*A. Aureobasidium pullulans* S20由来GLD (ApsGLD) の真核細胞による発現)

(1) 菌体培養

グルコース (ナカライ社製) 1% (W/V)、脱脂大豆 (昭和産業社製) 2% (W/V)、コーンステープリカー (サンエイ糖化社製) 0.5% (W/V)、硫酸マグネシウム七水和物 (ナカライ社製) 0.1% (W/V) 及び水からなる液体培地をpH 6.0に調整し、150 mLを500 mL容の坂口フラスコに入れ、121℃、20分間オートクレーブした。冷却した

この液体培地に、*Aureobasidium pullulans* S20株を接種し、15℃で90時間振とう培養した後、さらしを用いて、湿菌体を回収した。

[0056] (2) 全RNAの単離

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

[0057] (3) cDNAライブラリーの調製

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

[0058] (4) ApsGLD遺伝子のクローニング

(3) で取得したcDNAライブラリーを鋳型とし、ApsGLD遺伝子をPCR増幅した。プライマーは、本発明者らによって既に解明されていた複数のGLD配列から共通配列を解析し、その共通配列を基に同一性の低いGLD配列でも増幅するように、縮重塩基を用いてprimer-F1、primer-F2、primer-R1及びprimer-R2を設計した。第1段階目に、実施例2の(3)で取得したcDNAライブラリーを鋳型として、primer-F1及びprimer-R1を用いてPCRを行った。第2段階目に、第1段階目のPCR産物を鋳型として、primer-F2及びprimer-R2を用いてPCRを行った。該PCR産物を配列解析し、解読した内部配列から、遺伝子の開始コドン周辺及び終止コドン周辺を解明するためのプライマーを設計して、5′-RACE法及び3′-RACE法を行った。最終的に下記のprimer-ApsF及びprimer-ApsRのプライマー対を用いてPCRを行って、配列番号1に示す全鎖長1,776bpの*Aureobasidium pullulans* S20株由来ApsGLD遺伝子を含むDNA断片を取得した。当該遺伝子配列がコードするアミノ酸配列を配列番号2に示した。

尚、配列番号 2 記載のアミノ酸配列において、SignalP 4.1 によるシグナル配列予測を行い、配列番号 2 記載のアミノ酸配列のうち、1～16 番目までの 16 アミノ酸がシグナル配列と予測された。

primer-F1 : 5' -CGGCACTCAGATYGAYTGGGCRTA-3'

primer-F2 : 5' -AAGTTGGGHAACAACMTACMTGG-3'

primer-R1 : 5' -ATGCGCTCRGCAGCTCTCTCVGC-3'

primer-R2 : 5' -ACGCCACCGAGHTCCTYSGACATCAT-3'

primer-ApsF : 5' -(TGACCAATTCCGCAGCTCGTCAAA)ATGTATCGTTTACTCTCTACATTTG-3'

(括弧内：転写増強因子)

primer-ApsR : 5' -CGCTTCTAGAGCATGCCTACTGGTGGCTAGCCTCGATAAC-3'

(下線部：制限酵素部位 (SphI))

primer-GLD-F : 5' -CTCCAAGTTAGTCGAC(TGACCAATTCCGCAGCTCGTCAAA)-3'

(下線部：制限酵素部位 (SalI)、括弧内：転写増強因子)

[0059] (5) ApsGLD 遺伝子を含むプラスミドベクターの調製

公知文献 1 (Aspergillus 属の異種遺伝子発現系、峰時俊貴、化学と生物、38、12、831-838、2000) に記載してあるアスペルギルス・オリゼ由来のアミラーゼ系の改良プロモーターを使用してプラスミドベクターを調製した。最初に、(4) で得られた DNA 断片を鋳型として上記の primer-ApsR 及び primer-GLD-F のプライマー対を用いて PCR を行い、ApsGLD 遺伝子を増幅した。次にベクターのプロモーターの下流に、増幅した ApsGLD 遺伝子を結合させることで、該遺伝子が発現可能なプラスミドベクターを調製した。この発現用プラスミドベクターを大腸菌 JM109 株に導入して形質転換し、得られた形質転換体を培養して、集菌した菌体から、Illustra plasmid-prep Mini Flow Kit (GEヘルスケア社製) を用いてプラスミドを抽出した。該プラスミド中のインサートの配列解析を行ったところ、ApsGLD 遺伝子 (配列番号 1) が確認できた。

[0060] (6) 形質転換体の取得

(5) で抽出したプラスミドを用いて、公知文献2 (B i o s c i . B i o t e c h . B i o c h e m . , 6 1 (8) , 1 3 6 7 - 1 3 6 9 , 1 9 9 7) 及び公知文献3 (清酒用麹菌の遺伝子操作技術、五味勝也、醸協、4 9 4 - 5 0 2、2 0 0 0) に記載の方法に準じて、A p s G L Dを生産する組換えカビ (アスペルギルス・オリゼ) を作製し、得られた組換え株をC z a p e k - D o x 固体培地で純化した。使用する宿主としては、アスペルギルス・オリゼN S 4 株を使用した。本菌株は、公知文献2にあるように、1 9 9 7 年 (平成9 年) に醸造試験所で育種され、転写因子の解析、各種酵素の高生産株の育種などに利用され、現在は、独立行政法人酒類総合研究所 (〒7 39-0046日本国広島県東広島市鏡山3 - 7 - 1) 分譲されているものが入手可能である。

[0061] (7) 組換えカビ由来A p s G L Dの確認

パインデックス2 % (松谷化学工業社製) (w / v)、トリプトン1 % (B D社製) (w / v)、リン酸二水素カリウム0. 5 % (ナカライテスク社製) (w / v)、硫酸マグネシウム七水和物0. 0 5 % (w / v) (ナカライテスク社製) 及び水からなる液体培地1 0 m Lを太試験管 (2 2 m m × 2 0 0 m m) に入れ、1 2 1 °C、2 0 分間オートクレーブした。冷却したこの液体培地に、(6) で取得した形質転換体を植菌し、3 0 °Cで4 日間振とう培養した。培養終了後、遠心して上清を回収し、前述のG L D活性測定法に準じ、プレートリーダーを用いてG L D活性を測定したところ、本発明のG L D活性が確認できた。培養液をろ布でろ過し、回収したろ液を遠心して上清を回収し、更にメンブレンフィルター (1 0 μ m、アドバンテック社製) でろ過して培養上清を回収し、分画分子量1 0, 0 0 0の限外ろ過膜 (ザルトリウス社製) で濃縮した。本サンプルを組換えA p s G L Dサンプルとした。

[0062] [実施例3]

(B . A u r e o b a s i d i u m p u l l u l a n s N B R C 4 4 6

4株由来G L D (A p n G L D) の真核細胞による発現)

(1) A p n G L D 遺伝子のクローニング

実施例2 (1) ~ (3) に記載の方法に従って調製した A . p u l l u l a n s NBRC 4464 の c D N A ライブラリーを鋳型とし、A p n G L D 遺伝子を P C R 増幅した。

第1段階目及び第2段階目の P C R、並びに 5' - R A C E 法及び 3' - R A C E 法は実施例2 (4) に記載の方法に従って行った。最終的に下記の primer-ApnF 及び primer-ApnR のプライマー対を用いて P C R を行って、配列番号 3 に示す全鎖長 1, 770 b p の A . p u l l u l a n s NBRC 4464 株由来 A p n G L D 遺伝子を含む D N A 断片を取得した。当該遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号 4 に示した。

尚、配列番号 4 記載のアミノ酸配列において、S i g n a l P 4 . 1 によるシグナル配列予測を行い、配列番号 4 記載のアミノ酸配列のうち、1 ~ 15 番目までの 15 アミノ酸がシグナル配列と予測された。

primer-ApnF : 5' -(TGACCAATTCCGCAGCTCGTCAAA)ATGTTGGGACTTGCTACCCTCGCCC-3'

(括弧内：転写増強因子)

primer-ApnR : 5' -CGCTTCTAGAGCATGCTTAGTGACTGGCCTTGATGATATC-3'

(下線部：制限酵素部位 (S p h I))

[0063] (2) A p n G L D 遺伝子を含むプラスミドベクターの調製

(1) で得られた D N A 断片を鋳型として上記の primer-ApnR 及び primer-G L D -F のプライマー対を用いて P C R を行い、A p n G L D 遺伝子を増幅した。実施例2 (5) に記載の方法に従い、プロモーターの下流に、増幅した A p n G L D 遺伝子を結合させることで、該遺伝子が発現可能なプラスミドベクターを調製した。更に、実施例2の (5) に記載の方法に従い、該プラスミドを抽出し、インサートの配列解析を行ったところ、A p n G L D 遺伝子 (配列番号 3) が確認できた。

[0064] (3) 形質転換体の取得

(2) で抽出したプラスミドを用いて、実施例 2 の (6) に記載の方法に従い、A p n G L D を生産する組換えカビ (アスペルギルス・オリゼ) を作製し、得られた組換え株を C z a p e k - D o x 固体培地で純化した。

[0065] (4) 組換えカビ由来 A p n G L D の確認

実施例 2 の (7) に記載の方法に従い、A p n G L D の活性を測定したところ、本発明の G L D 活性が確認できた。実施例 2 の (7) に記載の方法に従い、培養液を限外ろ過で濃縮したサンプルを、組換え A p n G L D サンプルとした。

[0066] [実施例 4]

(C. K a b a t i e l l a c a u l i v o r a 由来 G L D (K c G L D) の真核細胞による発現)

(1) K c G L D 遺伝子のクローニング

実施例 2 (1) ~ (3) に記載の方法に従って調製した K. p u l l u l a n s NBRC 4464 の c D N A ライブラリーを鋳型とし、K c G L D 遺伝子を P C R 増幅した。

第 1 段階目及び第 2 段階目の P C R、並びに 5' - R A C E 法及び 3' - R A C E 法は実施例 2 (4) に記載の方法に従って行った。最終的に下記の primer-KcF 及び primer-KcR のプライマー対を用いて P C R を行って、配列番号 5 に示す全鎖長 1, 779 b p の K. c a u l i v o r a NBRC 7314 株由来 K c G L D 遺伝子配列を含む D N A 断片を取得した。当該遺伝子配列がコードするアミノ酸配列を配列番号 6 に示した。

尚、配列番号 6 記載のアミノ酸配列において、S i g n a l P 4. 1 によるシグナル配列予測を行い、配列番号 6 記載のアミノ酸配列のうち、1 ~ 16 番目までの 16 アミノ酸がシグナル配列と予測された。

primer-KcF : 5' -(TGACCAATTCCGCAGCTCGTCAAA)ATGTTGGGACAAGTTGCTGCTCTCG-3',

(括弧内 : 転写増強因子)

primer-KcR : 5' -CGCTTCTAGAGCATGCTTACAAGTGCTTGGCCTTGATGAG-3'

(下線部：制限酵素部位 (S p h I))

[0067] (2) K c G L D 遺伝子を含むプラスミドベクターの調製

(1) で得られた D N A 断片を鋳型として上記の primer-KcR 及び primer-GLD-F のプライマー対を用いて P C R を行い、K c G L D 遺伝子を増幅した。実施例 2 (5) に記載の方法に従い、プロモーターの下流に、増幅した K c G L D 遺伝子を結合させることで、該遺伝子が発現可能なプラスミドベクターを調製した。更に、実施例 2 の (5) に記載の方法に従い、該プラスミドを抽出し、インサートの配列解析を行ったところ、K c G L D 遺伝子 (配列番号 5) が確認できた。

[0068] (3) 形質転換体の取得

(2) で抽出したプラスミドを用いて、実施例 2 の (6) に記載の方法に従い、K c G L D を生産する組換えカビ (アスペルギルス・オリゼ) を作製し、得られた組換え株を C z a p e k - D o x 固体培地で純化した。

[0069] (4) 組換えカビ由来 K c G L D の確認

実施例 2 の (7) に記載の方法に従い、K c G L D の活性を測定したところ、本発明の G L D 活性が確認できた。

[0070] (5) K c G L D の精製

パインデックス 2 % (松谷化学工業社製) (w / v)、トリプトン 1 % (B D 社製) (w / v)、リン酸二水素カリウム 0.5 % (ナカライテスク社製) (w / v)、硫酸マグネシウム七水和物 0.05 % (w / v) (ナカライテスク社製) 及び水からなる液体培地 150 mL を 500 mL 容の坂口フラスコに入れ、121℃、20 分間オートクレーブした。冷却したこの液体培地に、(3) で取得した形質転換体を植菌し、30℃で3日間振とう培養して種培養液とした。前記と同様の培地組成に 0.01 % リボフラビン (ナカライテスク社製) (w / v)、0.005 % クロラムフェニコール (ナカライテスク社製) (w / v)、消泡剤を添加した培地 3.5 L を 5 L 容ジャーファーメンターに入れ、121℃、20 分間オートクレーブした。冷却したこの液体培地に、種培養液を 50 mL 植菌し、30℃、400 r p m、1

v / v / m で 3 日間培養した。培養終了後、培養液をろ布でろ過し、回収したろ液を遠心して上清を回収し、更にメンブレンフィルター（10 μ m、アドバンテック社製）でろ過して培養上清を回収し、分画分子量 8,000 の限外ろ過膜（ミリポア社製）で濃縮して粗酵素液とした。

[0071] 前記粗酵素液を、50%飽和硫酸アンモニウム溶液（pH 6.0）になるように調整し、4℃で一晩放置後、遠心分離して上清を回収した。

該上清を、50%飽和硫酸アンモニウムを含む 50 mM リン酸カリウム緩衝液（pH 6.0）で予め平衡化した TOYOPEARL Butyl-650C（東ソー社製）カラムに通液して酵素を吸着させた。該カラムを同緩衝液で洗浄した後、同緩衝液から 50 mM リン酸カリウム緩衝液（pH 6.0）へのグラジエント溶出法で酵素を溶出させて、活性画分を回収した。回収した活性画分を、限外濾過膜で濃縮後、脱塩し、1 mM リン酸カリウム緩衝液（pH 6.0）と平衡化させ、同緩衝液で予め平衡化した DEAE セルファイン A-500m（チッソ社製）カラムに通液して酵素を吸着させた。該カラムを同緩衝液で洗浄した後、同緩衝液から 200 mM リン酸カリウム緩衝液（pH 6.0）へのグラジエント溶出法で酵素を溶出させて、活性画分を回収した。回収した活性画分を、分画分子量 8,000 の限外ろ過膜で濃縮後、水置換したサンプルを、組換え KcGLD サンプルとした。該精製酵素の比活性は 1,200 U/mg だった。

[0072] [実施例 5]

（D. Kabatiella zeaе由来 GLD（KzGLD）の真核細胞による発現）

（1）KzGLD 遺伝子のクローニング

実施例 2（1）～（3）に記載の方法に従って調製した K. zeaе NBRC 9664 の cDNA ライブラリーを鋳型とし、KzGLD 遺伝子を PCR 増幅した。

第 1 段階目及び第 2 段階目の PCR、並びに 5' - RACE 法及び 3' - RACE 法は実施例 2（4）に記載の方法に従って行った。最終的に下記の pri

mer-KzF及びprimer-KzRのプライマー対を用いてPCRを行って、配列番号7に示す全鎖長1,776bpのK. zeae NBRC9664株由来KzGLD遺伝子を含むDNA断片を取得した。当該遺伝子配列がコードするアミノ酸配列を配列番号8に示した。

尚、配列番号8記載のアミノ酸配列において、SignalP4.1によるシグナル配列予測を行い、配列番号8記載のアミノ酸配列のうち、1～16番目までの16アミノ酸がシグナル配列と予測された。

primer-KzF : 5' -(TGACCAATTCCGCAGCTCGTCAAA)ATGTTGGGTCAATTGGCCGCTCTCG-3',

(括弧内：転写増強因子)

primer-KzR : 5' -CGCTTCTAGAGCATGCTTACTTGTGGCTAGCCTTGATGAG-3'

(下線部：制限酵素部位 (SphI))

[0073] (2) KzGLD遺伝子を含むプラスミドベクターの調製

(1)で得られたDNA断片を鋳型として上記のprimer-KzR及びprimer-GLD-Fのプライマー対を用いてPCRを行い、KzGLD遺伝子を増幅した。実施例2(5)に記載の方法に従い、プロモーターの下流に、増幅したKzGLD遺伝子を結合させることで、該遺伝子が発現可能なプラスミドベクターを調製した。更に、実施例2の(5)に記載の方法に従い、該プラスミドを抽出し、インサートの配列解析を行ったところ、KzGLD遺伝子(配列番号7)が確認できた。

[0074] (3) 形質転換体の取得

(2)で抽出したプラスミドを用いて、実施例2の(6)に記載の方法に従い、KzGLDを生産する組換えカビ(アスペルギルス・オリゼ)を作製し、得られた組換え株をCzapek-Dox固体培地で純化した。

[0075] (4) 組換えカビ由来KzGLDの確認

実施例2の(7)に記載の方法に従い、KzGLDの活性を測定したところ、本発明のGLD活性が確認できた。実施例2の(7)に記載の方法に従い、培養液を限外ろ過で濃縮したサンプルを、組換えKzGLDサンプルと

した。

[0076] [実施例 6]

(*E. Cladosporium* sp. T799 株由来 GLD (Cs7GLD) の真核細胞による発現)

(1) Cs7GLD 遺伝子のクローニング

実施例 2 (1) ~ (3) に記載の方法に従って調製した *C. sp. T799* の cDNA ライブラリーを鋳型とし、Cs7GLD 遺伝子を PCR 増幅した。

第1段階目及び第2段階目の PCR、並びに 5' - RACE 法及び 3' - RACE 法は実施例 2 (4) に記載の方法に従って行った。最終的に下記の primer-Cs7F 及び primer-Cs7R のプライマー対を用いて PCR を行って、配列番号 9 に示す全鎖長 1,761 bp の *C. sp. T799* 株由来 Cs7GLD 遺伝子配列を含む DNA 断片を取得した。当該遺伝子配列がコードするアミノ酸配列を配列番号 10 に示した。

尚、配列番号 10 記載のアミノ酸配列において、SignalP4.1 によるシグナル配列予測を行い、配列番号 10 記載のアミノ酸配列のうち、1 ~ 17 番目までの 17 アミノ酸がシグナル配列と予測された。

primer-Cs7F : 5' -(TGACCAATTCCGCAGCTCGTCAAA)ATGCTGCCACTGCTCGCGACTCTGG-3'

(括弧内：転写増強因子)

primer-Cs7R : 5' -CGCTTCTAGAGCATGCCTAGTTGCACTGCTTAATGCGCTC-3'

(下線部：制限酵素部位 (SphI))

[0077] (2) Cs7GLD 遺伝子を含むプラスミドベクターの調製

(1) で得られた DNA 断片を鋳型として上記の primer-Cs7R 及び primer-GLD-F のプライマー対を用いて PCR を行い、Cs7GLD 遺伝子を増幅した。実施例 2 (5) に記載の方法に従い、プロモーターの下流に、増幅した Cs7GLD 遺伝子を結合させることで、該遺伝子が発現可能なプラスミドベクターを調製した。更に、実施例 2 の (5) に記載の方法に従い、該プラス

ミドを抽出し、インサートの配列解析を行ったところ、C s 7 G L D 遺伝子（配列番号 9）が確認できた。

[0078] （３）形質転換体の取得

（２）で抽出したプラスミドを用いて、実施例 2 の（６）に記載の方法に従い、C s 7 G L D を生産する組換えカビ（アスペルギルス・オリゼ）を作製し、得られた組換え株を C z a p e k - D o x 固体培地で純化した。

[0079] （４）組換えカビ由来 C s 7 G L D の確認

実施例 2 の（７）に記載の方法に従い、C s 7 G L D の活性を測定したところ、本発明の G L D 活性が確認できた。実施例 2 の（７）に記載の方法に従い、培養液を限外ろ過で濃縮したサンプルを、組換え C s 7 G L D サンプルとした。

[0080] [実施例 7]

（F. F u s i c l a d i u m c a r p o p h i l u m 由来 G L D （F c G L D）の真核細胞による発現）

（１）F c G L D 遺伝子のクローニング

実施例 2 （１）～（３）に記載の方法に従って調製した F. c a r p o p h i l u m N B R C 9 6 4 5 の c D N A ライブラリーを鋳型とし、以下の P C R を行った。

第 1 段階目及び第 2 段階目の P C R、並びに 5' - R A C E 法及び 3' - R A C E 法は実施例 2 （４）に記載の方法に従って行った。その結果、F. c a r p o p h i l u m N B R C 9 6 4 5 株由来 F c G L D 遺伝子は、配列番号 1 1 に示す全鎖長 1, 7 6 1 b p の塩基配列であることが分かった。当該遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号 1 2 に示した。

尚、配列番号 1 2 記載のアミノ酸配列において、S i g n a l P 4. 1 によるシグナル配列予測を行い、配列番号 1 2 記載のアミノ酸配列のうち、1 ～ 1 7 番目までの 1 7 アミノ酸がシグナル配列と予測された。

[0081] （２）F c G L D 遺伝子を含むプラスミドベクターの調製

（１）で調製した c D N A ライブラリーを鋳型として下記の primer-FcF 及

びprimer-FcR1のプライマー対を用いてPCRを行い、終止コドンにTAAに置換したFcGLD遺伝子を増幅した。次に前記PCR産物を鋳型として下記のprimer-FcF及びprimer-FcR2のプライマー対を用いてPCRを行い、プラスミド挿入用の断片を増幅した。続いて、実施例2（5）に記載の方法に従い、プロモーターの下流に、増幅した前記断片を結合させることで、FcGLD遺伝子が発現可能なプラスミドベクターを調製した。更に、実施例2の（5）に記載の方法に従い、該プラスミドを抽出し、インサートの配列解析を行ったところ、配列番号11に記載の終止コドンにTAAに置換したFcGLD遺伝子が確認できた。

primer-FcF : 5' -(CCGCAGCTCGTCAAA) ATGCTCCCGATCCTCGCGTCT-3'

（括弧内：転写増強因子）

primer-FcR1 : 5' -GTTTCAT(TTA)GTGGCTCTCTTGAATGCG-3'

（括弧内：置換した終止コドン）

primer-FcR2 : 5' -GTTACGCTTCTAGAGCATGCGTTCAT(TTA)GTGGCTCTC-3'

（下線部：制限酵素部位（SphI）、括弧内：置換した終止コドン）

[0082] （3）形質転換体の取得

（2）で抽出したプラスミドを用いて、実施例2の（6）に記載の方法に従い、FcGLDを生産する組換えカビ（アスペルギルス・オリゼ）を作製し、得られた組換え株をCzapek-Dox固体培地で純化した。

[0083] （4）組換えカビ由来FcGLDの確認

実施例2の（7）に記載の方法に従い、FcGLDの活性を測定したところ、本発明のGLD活性が確認できた。

[0084] （5）FcGLDの精製

パインデックス2%（松谷化学工業社製）（w/v）、トリプトン1%（BD社製）（w/v）、リン酸二水素カリウム0.5%（ナカライテスク社製）（w/v）、硫酸マグネシウム七水和物0.05%（ナカライテスク社製）（w/v）及び水からなる液体培地10mLを太試験管（22mm×200mm）に入れ、121℃、20分間オートクレーブした。冷却したこの

液体培地に、(4)で取得した形質転換体を植菌し、30℃で3日間振とう培養して種培養液とした。前記と同様の培地組成に0.01%リボフラビン(ナカライテスク社製)(w/v)を添加した培地500mLを2000mL容坂口フラスコに入れ、121℃、20分間オートクレーブした。冷却したこの液体培地に、種培養液を10mL植菌し、30℃、110rpmで3日間振盪培養した。培養終了後、培養液をろ布でろ過し、回収したろ液を遠心して上清を回収し、更にメンブレンフィルター(10μm、アドバンテック社製)でろ過して培養上清を回収し、分画分子量8,000の限外ろ過膜(ミリポア社製)で濃縮して粗酵素液とした。

[0085] 前記粗酵素液を5mMリン酸カリウム緩衝液(pH6.0)と平衡化させ、同緩衝液で予め平衡化したDEAEセルファインA-500m(チッソ社製)カラムに通液して酵素を吸着させた。該カラムを同緩衝液で洗浄した後、同緩衝液から200mMリン酸カリウム緩衝液(pH6.0)へのグラジエント溶出法で酵素を溶出させて、活性画分を回収した。回収した活性画分を、分画分子量8,000の限外ろ過膜で濃縮後、水置換したサンプルを、組換えFcGLDサンプルとした。該精製酵素の比活性は190U/mgだった。

[0086] [実施例8]

(*G. Cladosporium* sp. T806由来GLD(Cs8GLD)の真核細胞による発現)

(1) Cs8GLD遺伝子のクローニング

実施例2(1)～(3)に記載の方法に従って調製したC. sp. T806のcDNAライブラリーを鋳型とし、以下のPCRを行った。

第1段階目及び第2段階目のPCR、並びに5'-RACE法及び3'-RACE法は実施例2(4)に記載の方法に従って行った。その結果、C. sp. T806株由来Cs8GLD遺伝子は、配列番号13に示す全鎖長1,761bpの塩基配列であることが分かった。当該遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号14に示した。

尚、配列番号 14 記載のアミノ酸配列において、SignalP 3.0 によるシグナル配列予測を行い、配列番号 14 記載のアミノ酸配列のうち、1 ～ 17 番目までの 17 アミノ酸がシグナル配列と予測された。

[0087] (2) Cs8GLD 遺伝子を含むプラスミドベクターの調製

(1) で調製した cDNA ライブラリーを鋳型として下記の primer-Cs8F 及び primer-Cs8R1 のプライマー対を用いて PCR を行い、終止コドンに TAA に置換した Cs8GLD 遺伝子を増幅した。次に前記 PCR 産物を鋳型として下記の primer-Cs8F 及び primer-Cs8R2 のプライマー対を用いて PCR を行い、プラスミド挿入用の断片を増幅した。続いて、実施例 2 (5) に記載の方法に従い、プロモーターの下流に、増幅した前記断片を結合させることで、Cs8GLD 遺伝子が発現可能なプラスミドベクターを調製した。更に、実施例 2 の (5) に記載の方法に従い、該プラスミドを抽出し、インサートの配列解析を行ったところ、配列番号 13 に記載の終止コドンに TAA に置換した Cs8GLD 遺伝子が確認できた。

primer-Cs8F : 5' -(CCGCAGCTCGTCAAA) ATGCTCCCAGTGCTCGCGTCT-3'

(括弧内：転写増強因子)

primer-Cs8R1 : 5' -GTTTCAT(TTA)GTGGCTCTGCTGAATACG-3'

(括弧内：置換した終止コドン)

primer-Cs8R2 : 5' -((GTTACGCTTCTAGA))GCATGCGTTCAT(TTA)GTGGCTCTG-3'

(下線部：制限酵素部位 (Sph I)、括弧内：置換した終止コドン)

[0088] (3) 形質転換体の取得

(2) で抽出したプラスミドを用いて、実施例 2 の (6) に記載の方法に従い、Cs8GLD を生産する組換えカビ (アスペルギルス・オリゼ) を作製し、得られた組換え株を Czapek-Dox 固体培地で純化した。

[0089] (4) 組換えカビ由来 Cs8GLD の確認

実施例 2 の (7) に記載の方法に従い、Cs8GLD の活性を測定したところ、本発明の GLD 活性が確認できた。

[0090] [実施例 9]

(*H. Cladosporium cladosporioides* 由来 G L D (C c G L D) の真核細胞による発現)

(1) C c G L D 遺伝子のクローニング

実施例 2 (1) ~ (3) に記載の方法に従って調製した *C. cladosporioides* NBRC 4459 の cDNA ライブラリーを鋳型とし、以下の P C R を行った。

第 1 段階目及び第 2 段階目の P C R、並びに 5' - R A C E 法及び 3' - R A C E 法は実施例 2 (4) に記載の方法に従って行った。その結果、*C. cladosporioides* NBRC 4459 株由来 C c G L D 遺伝子は、配列番号 15 に示す全鎖長 1, 761 b p の塩基配列であることが分かった。当該遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号 16 に示した。

尚、配列番号 16 記載のアミノ酸配列において、S i g n a l P 3. 0 によるシグナル配列予測を行い、配列番号 16 記載のアミノ酸配列のうち、1 ~ 17 番目までの 17 アミノ酸がシグナル配列と予測された。

[0091] (2) C c G L D 遺伝子を含むプラスミドベクター 1 の調製

(1) で調製した cDNA ライブラリーを鋳型として下記の primer-CcF 及び primer-CcR1 のプライマー対を用いて P C R を行い、終止コドンを TAA に置換した C c G L D 遺伝子 1761 b p を含む配列を増幅した。次に前記 P C R 産物を鋳型として下記の primer-CcF 及び primer-CcR2 のプライマー対を用いて P C R を行い、プラスミド挿入用の断片を増幅した。続いて、実施例 2 (5) に記載の方法に従い、プロモーターの下流に、増幅した前記断片を結合させることで、C c G L D 遺伝子が発現可能なプラスミドベクターを調製した。更に、実施例 2 の (5) に記載の方法に従い、該プラスミドを抽出し、インサートの配列解析を行ったところ、配列番号 15 の終止コドンを TAA に置換した C c G L D 遺伝子が確認できた。該遺伝子は終止コドン以外は野生型遺伝子のため、「野生型 C c G L D 遺伝子」と呼ぶ。

primer-CcF : 5' -(CCGCAGCTCGTCAAA) ATGCTCCCAATTATCGCGTCT-3'

(括弧内 : 転写増強因子)

primer-CcR1 : 5' -GTTTCAT(TTA)GTGGCTCTGCTGAATGCGCTC-3'

(括弧内：置換した終止コドン)

primer-CcR2 : 5' -GTTACGCTTCTAGAGCATGCGTTCAT(TTA)GTGGCTCTG-3'

(下線部：制限酵素部位 (S p h I)、括弧内：置換した終止コドン)

[0092] (3) C c G L D 遺伝子を含むプラスミドベクター 2 の調製

Aspergillus oryzae 由来 G L D のシグナル配列 (A o シグナル配列：配列番号 6 4) を用いて、成熟タンパクである C c G L D を菌体外に組換え生産するためのプラスミドベクターを調製した。詳細には、C c G L D 遺伝子の予想シグナル配列コード領域を、配列番号 6 3 に記載の A o シグナル配列コード領域に、置換した改変遺伝子を挿入したプラスミドベクターを調製した。

最初に、(1) で調製した c D N A ライブラリーを鋳型として下記の primer-A-CcF 及び上記 primer-CcR1 のプライマー対を用いて P C R を行い、C c G L D 遺伝子の予想シグナル配列コード領域を削除した。次に、配列番号 6 3 に記載の A o シグナル配列コード領域を付加するために段階的に P C R を行い、最終的に、primer-A-F 及び primer-CcR2 のプライマー対を用いて P C R を行った。その結果、配列番号 1 5 に記載の配列の内、1 ~ 5 1 番目の塩基配列を配列番号 6 3 に記載の 6 6 塩基に置換し、終止コドンを TAA に置換した、プラスミド挿入用の断片を増幅した。

続いて、実施例 2 (5) に記載の方法に従い、プロモーターの下流に、増幅した前記断片を結合させることで、改変 C c G L D 遺伝子が発現可能なプラスミドベクターを調製した。更に、実施例 2 の (5) に記載の方法に従い、該プラスミドを抽出し、インサートの配列解析を行った。その結果、配列番号 1 5 に記載の配列の内、1 ~ 5 1 番目の塩基配列を配列番号 6 3 に記載の 6 6 塩基に置換し、終止コドンを TAA に置換した (配列番号 6 3 記載の 6 6 b p の下流に、配列番号 1 5 記載の 5 2 ~ 1 7 6 0 番目の 1 7 0 9 b p が融合し、最後がアデニンである) 配列番号 2 4 に記載の 1 7 7 6 b p の改変遺伝子が確認できた。該遺伝子を「改変型 C c G L D 遺伝子」と呼ぶ。

primer-A-CcF : 5' -CCGGCTGGACGGGCCCATTCCACTCCCAGATACGAC-3'

(下線部 : A o シグナル配列コード領域)

primer-A-F : 5' -(CCGCAGCTCGTCAAA)ATGCTCTTCTCACTGGCATTC-3'

(括弧内 : 転写増強因子、下線部 : A o シグナル配列コード領域)

[0093] (4) 形質転換体の取得

野生型 C c G L D 遺伝子が挿入された (2) 又は改変型 C c G L D 遺伝子が挿入された (3) のプラスミドをそれぞれ用いて、実施例 2 の (6) に記載の方法に従い、野生型 C c G L D 遺伝子又は改変型 C c G L D 遺伝子を含む組換えカビ (アスペルギルス・オリゼ) をそれぞれ作製した。得られたそれぞれの組換え株を C z a p e k - D o x 固体培地で純化した。

[0094] (5) 組換えカビ由来 C c G L D の確認

実施例 2 の (7) に記載の方法に従い、それぞれの組換えカビ由来の C c G L D の活性を測定したところ、野生型遺伝子由来 C c G L D も改変型遺伝子由来 C c G L D も、何れも本発明の G L D 活性が確認でき、何れの組換えカビも同等の生産性であり、何れの C c G L D も比活性は同等だった。

[0095] [実施例 10]

(I. *Cladosporium funiculosum* 由来 G L D (C f G L D) の真核細胞による発現)

(1) C f G L D 遺伝子のクローニング

実施例 2 (1) ~ (3) に記載の方法に従って調製した C. *funiculosum* NBRC 6537 の c D N A ライブラリーを鋳型とし、以下の P C R を行った。

第1段階目及び第2段階目の P C R、並びに 5' - R A C E 法及び 3' - R A C E 法は実施例 2 (4) に記載の方法に従って行った。その結果、C. *funiculosum* NBRC 6537 株由来 C f G L D 遺伝子は、配列番号 17 に示す全鎖長 1,761 b p の塩基配列であることが分かった。当該遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号 18 に示した。

尚、配列番号 18 記載のアミノ酸配列において、S i g n a l P 3.0 に

よるシグナル配列予測を行い、配列番号 18 記載のアミノ酸配列のうち、1～17 番目までの 17 アミノ酸がシグナル配列と予測された。

[0096] (2) C f G L D 遺伝子を含むプラスミドベクターの調製

Aspergillus oryzae 由来 G L D のシグナル配列 (A o シグナル配列: 配列番号 64) を用いて、成熟タンパクである C f G L D を菌体外に組換え生産するためのプラスミドベクターを調製した。詳細には、C f G L D 遺伝子の予想シグナル配列コード領域を、配列番号 63 に記載の A o シグナル配列コード領域に、置換した改変遺伝子を挿入したプラスミドベクターを調製した。

最初に、(1) で調製した c D N A ライブラリーを鋳型として下記の primer-A-CfF 及び primer-CfR1 のプライマー対を用いて P C R を行い、C f G L D 遺伝子の予想シグナル配列コード領域を削除した。次に、配列番号 63 に記載の A o シグナル配列コード領域を付加するために段階的に P C R を行い、最終的に、前記の primer-A-F 及び下記の primer-CfR2 のプライマー対を用いて P C R を行った。その結果、配列番号 17 に記載の配列の内、1～51 番目の塩基配列を配列番号 63 に記載の 66 塩基に置換し、終止コドンを TAA に置換した、プラスミド挿入用の断片を増幅した。

続いて、実施例 2 (5) に記載の方法に従い、プロモーターの下流に、増幅した前記断片を結合させることで、改変 C f G L D 遺伝子が発現可能なプラスミドベクターを調製した。更に、実施例 2 の (5) に記載の方法に従い、該プラスミドを抽出し、インサートの配列解析を行った。その結果、配列番号 17 に記載の配列の内、1～51 番目の塩基配列を配列番号 63 に記載の 66 塩基に置換し、終止コドンを TAA に置換した (配列番号 63 記載の 66 b p の下流に、配列番号 17 記載の 52～1760 番目の 1709 b p が融合し、最後がアデニンである) 配列番号 26 に記載の 1776 b p の改変遺伝子が確認できた。該遺伝子を「改変型 C f G L D 遺伝子」と呼ぶ。

primer-A-CfF: 5' -CCGGCTGGACGGGCCCATTCCACTCCTAGATATGAC-3'

(下線部: A o シグナル配列コード領域)

primer-CfR1 : 5' -GTTTCAT(TTA)GTGACTGTGCTGAATACG-3'

(括弧内：置換した終止コドン)

primer-CfR2 : 5' -GTTACGCTTCTAGAGCATGCGTTCAT(TTA)GTGACTGTG-3'

(下線部：制限酵素部位 (S p h I)、括弧内：置換した終止コドン)

[0097] (3) 形質転換体の取得

改変型C f G L D遺伝子が挿入された(2)のプラスミドをそれぞれ用いて、実施例2の(6)に記載の方法に従い、改変型C f G L D遺伝子を含む組換えカビ(アスペルギルス・オリゼ)を作製し、得られた組換え株をC z a p e k - D o x 固体培地で純化した。

[0098] (4) 組換えカビ由来C f G L Dの確認

実施例2の(7)に記載の方法に従い、改変型遺伝子由来C f G L Dの活性を測定したところ、本発明のG L D活性が確認でき、該C f G L Dは実施例9記載の野生型遺伝子由来C c G L Dと同等の比活性だった。

[0099] [実施例11]

(J. C l a d o s p o r i u m o x y s p o r u m由来G L D (C o G L D)の真核細胞による発現)

(1) C o G L D遺伝子のクローニング

実施例2(1)～(3)に記載の方法に従って調製したC. o x y s p o r u m N B R C 3 2 5 1 1のc D N Aライブラリーを鋳型とし、以下のP C Rを行った。

第1段階目及び第2段階目のP C R、並びに5' - R A C E法及び3' - R A C E法は実施例2(4)に記載の方法に従って行った。その結果、C. o x y s p o r u m N B R C 3 2 5 1 1株由来C o G L D遺伝子は、配列番号19に示す全鎖長1, 761bpの塩基配列であることが分かった。当該遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号20に示した。

尚、配列番号20記載のアミノ酸配列において、S i g n a l P 3. 0によるシグナル配列予測を行い、配列番号20記載のアミノ酸配列のうち、1～17番目までの17アミノ酸がシグナル配列と予測された。

[0100] (2) C o G L D遺伝子を含むプラスミドベクター1の調製

(1)で調製したcDNAライブラリーを鋳型として下記のprimer-CoF及びprimer-CoR1のプライマー対を用いてPCRを行い、終止コドンにTAAに置換したC o G L D遺伝子1761bpを含む配列を増幅した。次に前記PCR産物を鋳型として下記のprimer-CoF及びprimer-CoR2のプライマー対を用いてPCRを行い、プラスミド挿入用の断片を増幅した。続いて、実施例2(5)に記載の方法に従い、プロモーターの下流に、増幅した前記断片を結合させることで、C o G L D遺伝子が発現可能なプラスミドベクターを調製した。更に、実施例2の(5)に記載の方法に従い、該プラスミドを抽出し、インサートの配列解析を行ったところ、配列番号19の終止コドンにTAAに置換したC o G L D遺伝子が確認できた。該遺伝子は終止コドン以外は野生型遺伝子のため、「野生型C o G L D遺伝子」と呼ぶ。

primer-CoF : 5' -(CCGCAGCTCGTCAAA) ATGCTCCCAGTGCTCGCGTCT-3'

(括弧内：転写増強因子)

primer-CoR1 : 5' -GTTTCAT(TTA)GTGGCTCTGCTGAATACGCTC-3'

(括弧内：置換した終止コドン)

primer-CoR2 : 5' -GTTACGCTTCTAGAGCATGCGTTTCAT(TTA)GTGGCTCTG-3'

(下線部：制限酵素部位(SphI)、括弧内：置換した終止コドン)

[0101] (3) C o G L D遺伝子を含むプラスミドベクター2の調製

*Aspergillus oryzae*由来GLDのシグナル配列(A oシグナル配列：配列番号64)を用いて、成熟タンパクであるC o G L Dを菌体外に組換え生産するためのプラスミドベクターを調製した。詳細には、C o G L D遺伝子の予想シグナル配列コード領域を、配列番号63に記載のA oシグナル配列コード領域に、置換した改変遺伝子を挿入したプラスミドベクターを調製した。

最初に、(1)で調製したcDNAライブラリーを鋳型として下記のprimer-A-CoF及び上記primer-CoR1のプライマー対を用いてPCRを行い、C o G L D遺伝子の予想シグナル配列コード領域を削除した。次に、配列番号63

に記載のA o シグナル配列コード領域を付加するために段階的にPCRを行い、最終的に、前記のprimer-A-F及び上記のprimer-CoR2のプライマー対を用いてPCRを行った。その結果、配列番号19に記載の配列の内、1～51番目の塩基配列を配列番号63に記載の66塩基に置換し、終止コドンでTAAに置換した、プラスミド挿入用の断片を増幅した。

続いて、実施例2(5)に記載の方法に従い、プロモーターの下流に、増幅した前記断片を結合させることで、改変C o G L D 遺伝子が発現可能なプラスミドベクターを調製した。更に、実施例2の(5)に記載の方法に従い、該プラスミドを抽出し、インサートの配列解析を行った。その結果、配列番号19に記載の配列の内、1～51番目の塩基配列を配列番号63に記載の66塩基に置換し、終止コドンでTAAに置換した(配列番号63記載の66bpの下流に、配列番号19記載の52～1760番目の1709bpが融合し、最後がアデニンである)配列番号28に記載の1776bpの改変遺伝子が確認できた。該遺伝子を「改変型C o G L D 遺伝子」と呼ぶ。

primer-A-CoF : 5' -CCGGCTGGACGGGCCCATTCTACTCCCAGATACGAC-3'

(下線部 : A o シグナル配列コード領域)

[0102] (4) 形質転換体の取得

野生型C o G L D 遺伝子が挿入された(2)又は改変型C o G L D 遺伝子が挿入された(3)のプラスミドをそれぞれ用いて、実施例2の(6)に記載の方法に従い、野生型C o G L D 遺伝子又は改変型C o G L D 遺伝子を含む組換えカビ(アスペルギルス・オリゼ)をそれぞれ作製した。得られたそれぞれの組換え株をC z a p e k -D o x 固体培地で純化した。

[0103] (5) 組換えカビ由来C o G L D の確認

実施例2の(7)に記載の方法に従い、それぞれの組換えカビ由来のC o G L D の活性を測定したところ、野生型遺伝子由来C o G L D も改変型遺伝子由来C o G L D も、何れも本発明のG L D 活性が確認でき、何れの組換えカビも同等の生産性であり、何れのC o G L D も比活性は同等だった。

[0104] [実施例12]

(N末端配列解析)

(1) A p s G L D

実施例1に記載の精製A p s G L DのN末端配列解析を実施した。その結果、成熟タンパクである該酵素のN末端のアミノ酸はI P N T Lであることが明らかになった。このことから、配列番号2記載のアミノ酸配列のうち、1～16番目までのアミノ酸配列がシグナル配列であり、成熟タンパクであるA p s G L Dは配列番号2記載の17～591番目の575アミノ酸からなるアミノ酸配列を有していると思われる。更に、成熟タンパクをコードしている塩基配列は、配列番号1の49～1776番目の1725塩基からなる塩基配列（終止コドン含まない）であると思われる。

尚、該シグナル配列は、S i g n a l P 4. 1による予測と一致していた。

[0105] (2) K c G L D

実施例4に記載の精製K c G L DのN末端配列解析を実施した。その結果、成熟タンパクである該酵素のN末端のアミノ酸はS T P S Rであることが明らかになった。従って、成熟タンパクのアミノ酸配列は、配列番号6記載のアミノ酸配列のうち、24～592番目の569アミノ酸からなるアミノ酸配列であることが分かった。更に、配列番号6記載のアミノ酸配列のうち、1～23番目までのアミノ酸配列がシグナル配列であり、該シグナル配列は成熟タンパクとなる過程で切断されていることが分かった。加えて、成熟タンパクをコードしている塩基配列は、配列番号5の70～1776番目の1707塩基からなる塩基配列（終止コドン含まない）であることが分かった。

尚、該シグナル配列は、S i g n a l P 4. 1による予測より7アミノ酸長い配列であり、つまり予測のN末端は7アミノ酸が付加したN末端だった。

[0106] (3) F c G L D

実施例7に記載の精製F c G L DのN末端配列解析を実施した。その結果

、成熟タンパクである該酵素のN末端のアミノ酸はA P T V Lであることが明らかになった。従って、成熟タンパクのアミノ酸配列は、配列番号12記載のアミノ酸配列のうち、12～586番目の575アミノ酸からなるアミノ酸配列であることが分かった。更に、配列番号12記載のアミノ酸配列のうち、1～11番目までのアミノ酸配列がシグナル配列であり、該シグナル配列は成熟タンパクとなる過程で切断されていることが分かった。加えて、成熟タンパクをコードしている塩基配列は、配列番号11の34～1758番目の1725塩基からなる塩基配列（終止コドン含まない）であることが分かった。

尚、該シグナル配列は、S i g n a l P 4. 1による予測より6アミノ酸短い配列であり、つまり予測のN末端は6アミノ酸が欠失したN末端だった。

[0107] (4) A p n G L D

(1)のA p s G L D又は(2)のK c G L Dの解析結果から、成熟タンパクであるA p n G L DのN末端のアミノ酸はA P N T L又はS T P R Yと思われる。従って、成熟タンパクのアミノ酸配列は、配列番号4記載のアミノ酸配列のうち、16～589番目の574アミノ酸又は23～589番目の567アミノ酸からなるアミノ酸配列であると思われる。更に、配列番号4記載のアミノ酸配列のうち、1～15番目又は1～22番目までのアミノ酸配列がシグナル配列であると思われる。加えて、成熟タンパクをコードしている塩基配列は、配列番号3の46～1767番目の1722塩基又は配列番号3の67～1767番目の1701塩基からなる塩基配列（終止コドン含まない）であると思われる。

[0108] (5) K z G L D

(1)のA p s G L D又は(2)のK c G L Dの解析結果から、成熟タンパクであるK z G L DのN末端のアミノ酸はI P S T L又はH I A R Yと思われる。従って、成熟タンパクのアミノ酸配列は、配列番号8記載のアミノ酸配列のうち、17～591番目の575アミノ酸又は24～591番目の

５６８アミノ酸からなるアミノ酸配列であると思われる。更に、配列番号８記載のアミノ酸配列のうち、１～１６番目又は１～２３番目までのアミノ酸配列がシグナル配列であると思われる。加えて、成熟タンパクをコードしている塩基配列は、配列番号７の４９～１７７３番目の１７２５塩基又は配列番号７の７０～１７７３番目の１７０４塩基からなる塩基配列（終止コドン含まない）であると思われる。

[0109] (6) C s 7 G L D

(３)のF c G L Dの解析結果から、成熟タンパクであるC s 7 G L DのN末端のアミノ酸はV P A S Lと思われる。従って、成熟タンパクのアミノ酸配列は、配列番号１０記載のアミノ酸配列のうち、１２～５８６番目の５７５アミノ酸からなるアミノ酸配列であると思われる。更に、配列番号１０記載のアミノ酸配列のうち、１～１１番目までのアミノ酸配列がシグナル配列であると思われる。加えて、成熟タンパクをコードしている塩基配列は、配列番号９の３４～１７５８番目の１７２５塩基からなる塩基配列（終止コドン含まない）であると思われる。

[0110] (7) C s 8 G L D

(３)のF c G L Dの解析結果から、成熟タンパクであるC s 8 G L DのN末端のアミノ酸はA P T T Lと思われる。従って、成熟タンパクのアミノ酸配列は、配列番号１４記載のアミノ酸配列のうち、１２～５８６番目の５７５アミノ酸からなるアミノ酸配列であると思われる。更に、配列番号１４記載のアミノ酸配列のうち、１～１１番目までのアミノ酸配列がシグナル配列であると思われる。加えて、成熟タンパクをコードしている塩基配列は、配列番号１３の３４～１７５８番目の１７２５塩基からなる塩基配列（終止コドン含まない）であると思われる。

[0111] (8) C c G L D

(３)のF c G L Dの解析結果から、成熟タンパクであるC c G L DのN末端のアミノ酸はA P T A Lと思われる。従って、成熟タンパクのアミノ酸配列は、配列番号１６記載のアミノ酸配列のうち、１２～５８６番目の５７

5 アミノ酸からなるアミノ酸配列であると思われる。更に、配列番号 16 記載のアミノ酸配列のうち、1～11 番目までのアミノ酸配列がシグナル配列であると思われる。加えて、成熟タンパクをコードしている塩基配列は、配列番号 15 の 34～1758 番目の 1725 塩基からなる塩基配列（終止コドン含まない）であると思われる。

[0112] (9) C f G L D

(3) の F c G L D の解析結果から、成熟タンパクである C f G L D の N 末端のアミノ酸は A P T A L と思われる。従って、成熟タンパクのアミノ酸配列は、配列番号 18 記載のアミノ酸配列のうち、12～586 番目の 575 アミノ酸からなるアミノ酸配列であると思われる。更に、配列番号 18 記載のアミノ酸配列のうち、1～11 番目までのアミノ酸配列がシグナル配列であると思われる。加えて、成熟タンパクをコードしている塩基配列は、配列番号 17 の 34～1758 番目の 1725 塩基からなる塩基配列（終止コドン含まない）であると思われる。

[0113] (10) C o G L D

(3) の F c G L D の解析結果から、成熟タンパクである C o G L D の N 末端のアミノ酸は A P T A L と思われる。従って、成熟タンパクのアミノ酸配列は、配列番号 20 記載のアミノ酸配列のうち、12～586 番目の 575 アミノ酸からなるアミノ酸配列であると思われる。更に、配列番号 20 記載のアミノ酸配列のうち、1～11 番目までのアミノ酸配列がシグナル配列であると思われる。加えて、成熟タンパクをコードしている塩基配列は、配列番号 19 の 34～1758 番目の 1725 塩基からなる塩基配列（終止コドン含まない）であると思われる。

[0114] (11) 改変型遺伝子由来 G L D

(3) の F c G L D の解析結果から、実施例 9、10 及び 11 で得られた改変型遺伝子由来 G L D は、野生型遺伝子由来の成熟タンパク（野生型 G L D）と比べて、N 末端の 6 アミノ酸が欠失した改変型 G L D であると思われる。

[0115] つまり、改変型C c G L D遺伝子は、組換え体から得られる成熟タンパクが、配列番号16記載のアミノ酸配列のうち、18～586番目の569アミノ酸になるように設計したため、成熟タンパクのアミノ酸配列は配列番号25に示すとおりであって、N末端のアミノ酸はH S T P Rである。野生型C c G L Dは12～586番目の575アミノ酸からなるアミノ酸配列であると思われるため、改変型C c G L D遺伝子由来G L Dは、N末端の6アミノ酸が欠失した改変型C c G L Dであると思われる。

同様に、改変型C f G L D遺伝子は、組換え体から得られる成熟タンパクが、配列番号18記載のアミノ酸配列のうち、18～586番目の569アミノ酸になるように設計したため、成熟タンパクのアミノ酸配列は配列番号27に示すとおりであって、N末端のアミノ酸はH S T P Rである。野生型C f G L Dは12～586番目の575アミノ酸からなるアミノ酸配列であると思われるため、改変型C f G L D遺伝子由来G L Dは、N末端の6アミノ酸が欠失した改変型C f G L Dであると思われる。

同様に、改変型C o G L D遺伝子は、組換え体から得られる成熟タンパクが、配列番号20記載のアミノ酸配列のうち、18～586番目の569アミノ酸になるように設計したため、成熟タンパクのアミノ酸配列は配列番号29に示すとおりであって、N末端のアミノ酸はH S T P Rである。野生型C o G L Dは12～586番目の575アミノ酸からなるアミノ酸配列であると思われるため、改変型C o G L D遺伝子由来G L Dは、N末端の6アミノ酸が欠失した改変型C o G L Dであると思われる。

[0116] N末端が欠失した改変型G L Dであっても、実施例9(5)、10(4)及び11(5)に示すように、野生型G L Dと同じ活性を有し、組換えカビの生産性も同等であり、比活性も野生型G L Dと同等だった。

[0117] [実施例13]

(本発明のG L Dの酵素化学的性質の検討)

実施例2～7で得られた各G L Dの諸性質を調べた。

(1) 吸収スペクトルの測定

各GLDについて、D-グルコース添加前後の200-700nmにおける吸収スペクトルをプレートリーダー（SPECTRA MAX PLUS 384、モレキュラーデバイス社製）を用いて測定した結果、何れのGLDについても、波長360-380nm付近及び波長450-460nm付近に認められた吸収極大が、D-グルコース添加により消失したことから、本発明のGLDは何れもフラビン結合型タンパク質であることが明らかになった。

[0118] (2) グルコース酸化酵素（GOD）活性の測定

各GLDのGOD活性を調べた結果、何れのGLDについてもGOD活性は見られなかった。よって、本発明のGLDは酸素を電子受容体として利用しないため、D-グルコースを定量する際に反応系の溶存酸素の影響を受けにくいことが示された。GOD活性は、以下の方法で測定した。100mMリン酸カリウム緩衝液（pH7.0）1.00mL、25mM 4-アミノアンチピリン0.10mL、420mMフェノール0.10mL、ペルオキシダーゼ（100units/mL）0.10mL、超純水0.65mL、D-グルコース1.00mLを混合し、37℃で5分間保温後、酵素サンプル0.05mLを添加し、反応を開始した。反応開始時から酵素反応の進行に伴う500nmにおける吸光度の1分間あたりの増加量（ ΔA_{500} ）を測定し、式2に従いGOD活性を算出した。この際GOD活性は、37℃、pH7.0で、1分間に1 μ molの過酸化水素を生成する酵素量を1Uと定義した。

[0119] [数2]

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

[0120] 尚、式中の3.0は反応試薬+酵素溶液の液量（mL）、10.66は本

測定条件におけるモル吸光係数 ($\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$)、0.5は1モルの過酸化水素の生成量に対するキノン型色素の生成量、1.0はセルの光路長 (cm)、0.05は酵素溶液の液量 (mL)、 $\Delta A 500 \text{ blank}$ は酵素の希釈に用いた溶液を酵素溶液の代わりに添加して反応開始した場合の500 nmにおける吸光度の1分間あたりの増加量、dfは希釈倍率を表す。

[0121] (3) 分子量

各GLDの糖鎖切断前後の分子量を以下の方法で求めた。各GLD溶液 (各1.0 mg / mg に調製) 5 μL と1% SDS 及び2% β -メルカプトエタノールを含む0.4 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0) 5 μL を混合し、100°Cで3分間熱処理を行った。糖鎖切断処理として、熱処理後のサンプルにエンドグリコシダーゼH (ロシュ製) を10 μL (50 mU) 添加し、37°Cで18時間反応させた。糖鎖切断処理前後のサンプルをe-パジエル7.5% (アトー社製) を用いたSDS-ポリアクリルアミド電気泳動に供し、分子量マーカーより分子量を求めた。結果を図1に示す。泳動サンプルは以下の通りである。

図1 (A)

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

レーン2 : Aps GLD 糖鎖切断前

レーン3 : Aps GLD 糖鎖切断後

図1 (B)

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

レーン2 : Apn GLD 糖鎖切断前

レーン3 : A p n G L D糖鎖切断後

図1 (C)

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

レーン2 : K c G L D糖鎖切断前

レーン3 : K c G L D糖鎖切断後

図1 (D)

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

レーン2 : K z G L D糖鎖切断前

レーン3 : K z G L D糖鎖切断後

図1 (E)

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

レーン2 : C s 7 G L D糖鎖切断前

レーン3 : C s 7 G L D糖鎖切断後

図1 (F)

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

レーン2 : F c G L D糖鎖切断前

レーン 3 : F c G L D 糖鎖切断後

[0122] 図 1 より、糖鎖切断前の各 G L D について、A p s G L D の分子量は 1 0 0 ~ 1 1 5 k D a 、 A p n G L D の分子量は 9 5 ~ 1 2 0 k D a 、 K c G L D の分子量は 8 5 ~ 1 1 5 k D a 、 K z G L D の分子量は 9 5 ~ 1 1 5 k D a 、 C s 7 G L D の分子量は 9 0 ~ 1 0 5 k D a 、 F c G L D の分子量は 8 5 ~ 1 1 0 k D a であり、糖鎖切断後の分子量は、何れも 6 0 ~ 7 0 k D a だった。

[0123] (4) 基質特異性

前記活性測定法に準じ、基質に D-グルコース、マルトース、D-ガラクトース、D-フルクトース、ソルビトール、ラクトース、スクロース、D-キシロース、D-マンノース及びトレハロースをそれぞれ用いて、各基質に対する各 G L D の活性を測定した。D-グルコースに対する活性を 1 0 0 % として、各基質の相対活性を算出した結果を表 1 に示す。

[0124] [表1]

基質	相対活性 (%)					
	(A) A p s G L D	(B) A p n G L D	(C) K c G L D	(D) K z G L D	(E) C s G L D	(F) F c G L D
D-グルコース	1 0 0	1 0 0	1 0 0	1 0 0	1 0 0	1 0 0
マルトース	5. 6	4. 4	2. 0	2. 2	3. 7	2. 2
D-キシロース	1 7	1 7	2 2	4 2	3 6	2 1
D-ガラクトース	5. 2	4. 1	1. 0	2. 4	3. 3	4. 5
D-フルクトース	0. 1 >	0. 1 1	0. 1 >	0. 1 >	0. 1 8	0. 1 >
D-マンノース	1 1	8. 1	4. 1	3. 9	8. 9	7. 8
ソルビトール	0. 1 3	0. 1 >	0. 1 >	0. 1 3	0. 1 1	0. 1 >
ラクトース	0. 1 >	0. 1 >	0. 1 >	0. 1 >	0. 1 >	0. 1 >
トレハロース	2 2	1 9	9. 8	1 0	2 2	1 0
スクロース	0. 2 7	0. 1 >	0. 1 >	0. 2 7	0. 3 7	0. 3 7

[0125] 本発明の G L D は、D-グルコースに対する活性を 1 0 0 % とした場合に、マルトース、D-ガラクトース、D-フルクトース、ソルビトール、ラクトース及びスクロースに対する反応性が 1 0 % 以下で、更に D-フルクトース、ソルビトール、ラクトース及びスクロースに対する活性は 1 % 以下であった。

[0126] (5) 至適温度の範囲

前記活性測定法に準じ、種々の温度にて各GLDの活性を測定した。基質の終濃度は10mM及び50mMとした。結果を図2に示す（図2（A）はApsGLD、図2（B）はApnGLD、図2（C）はKcGLD、図2（D）はKzGLD、図2（E）はCs7GLD、図2（F）はFcGLDを示す）。具体的には、基質の終濃度が10mMの場合、100mMリン酸カリウム緩衝液（pH6.0）1.00mL、1M D-グルコース溶液0.03mL、超純水1.58mL、3mM DCIP 0.14mL及び3mM 1-m-PMS 0.20mLを混合し、基質の終濃度が50mMの場合、100mMリン酸カリウム緩衝液（pH6.0）1.00mL、1M D-グルコース溶液0.15mL、超純水1.46mL、3mM DCIP 0.14mL及び3mM 1-m-PMS 0.20mLを混合し、何れの基質の終濃度の場合も37℃で保温する代わりに各温度で10分間保温し、酵素サンプル0.05mLを添加し、各温度にて反応を開始した。反応開始時から5分間、酵素反応の進行に伴う600nmにおける吸光度の1分間あたりの減少量を測定し、直線部分から前記式1に従いGLD活性を算出した。その結果、各GLDが最大活性を示す温度における活性値を100%とした場合に、基質濃度10mMでは、ApsGLDは30～40℃で80%以上、ApnGLDは30～40℃で80%以上、KcGLDは30℃で80%以上、KzGLDは20～30℃で80%以上、Cs7GLDは30℃で80%以上、FcGLDは30～40℃で80%以上の相対活性で、基質濃度50mMでは、ApsGLDは40℃で80%以上、ApnGLDは30～40℃で80%以上、KcGLDは30～40℃で80%以上、KzGLDは30℃で80%以上、Cs7GLDは30～40℃で80%以上、FcGLDは30～40℃で80%以上の相対活性で、何れの基質濃度においても、ApsGLDは40℃で80%以上、ApnGLDは30～40℃で80%以上、KcGLDは30℃で80%以上、KzGLDは30℃で80%以上、Cs7GLDは30℃で80%以上、FcGLDは30～40℃で80%以上の相対活性であった。以上から、本発明のGLDの至適温度は、最大活性を示す温

度における活性値を100%とした場合に、基質濃度10mMでは30℃、基質濃度50mMでは30又は40℃で相対活性値が80%以上であった。

[0127] (6) 温度特性

前記活性測定法に準じ、各温度にて各GLDの活性を測定した。基質の終濃度は10mM及び50mMとした。30℃を100%とした時の各温度の相対活性を表2に示した。その結果、30℃における活性値を100%とした場合に、10～40℃における活性値の範囲は、基質濃度10mMでは、ApsGLDは53.0～111%、ApnGLDは62.1～106%、KcGLDは52.0～100%、KzGLDは58.4～100%、Cs7GLDは55.1～100%、FcGLDは51.6～112%で、基質濃度50mMでは、ApsGLDは50.9～136%、ApnGLDは55.9～119%、KcGLDは50.4～100%、KzGLDは56.7～100%、Cs7GLDは55.2～100%、FcGLDは51.5～117%であった。

以上から、本発明のGLDは、30℃における活性値を100%とした場合に、10～40℃における活性値の範囲が20～150%であり、30℃における活性値を100%とした場合に、10℃における活性値が20%以上、20℃における活性値が40%以上であることがわかった。よって、本発明のGLDは何れも広い温度範囲で活性の変動が少ない酵素である。

[0128]

[表2]

サンプル	基質濃度	相対活性 (%)			
		10	20	30	40
(A) ApsGLD	10mM	53.0	77.6	100	111
	50mM	50.9	73.7	100	136
(B) AprGLD	10mM	62.1	83.7	100	106
	50mM	55.9	73.7	100	119
(C) KcGLD	10mM	52.0	76.9	100	65.4
	50mM	50.4	72.9	100	87.2
(D) KzGLD	10mM	58.4	89.1	100	75.2
	50mM	56.7	78.3	100	77.8
(E) Cs7GLD	10mM	55.1	78.0	100	69.8
	50mM	55.2	72.6	100	99.4
(F) FcGLD	10mM	51.6	74.0	100	112
	50mM	51.5	75.9	100	117

[0129] (8) pH安定性

FcGLDを6U/mLに調製し、終濃度が100mM酢酸ナトリウム緩衝液(図中ひし形印でプロット)、100mMクエン酸ナトリウム緩衝液(図中四角印でプロット)、100mMリン酸ナトリウム緩衝液(図中黒丸印でプロット)、100mMリン酸カリウム緩衝液(図中三角印でプロット)、100mM Tris-HCl緩衝液(図中白丸印でプロット)又は100mMグリシン-NaOH緩衝液(図中×でプロット)になるように各緩衝液を添加し、30℃で1時間処理した後、前記酵素活性測定方法で酵素活性を測定した。酵素活性の残存率を算出し、安定pHとして図4に示した。

その結果、FcGLDが最も安定だったpHの緩衝液で処理した酵素の活性を100%とした場合に、pH5.0~7.5で80%以上、pH4.0~8.0で60%以上の残存活性だった。尚、同じpHであっても緩衝液の種類によって残存活性は異なり、リン酸カリウム緩衝液は、pHが7付近又はアルカリ側で、同じpHの他の緩衝液に比べ、安定性が低い傾向がみられた。

[0130] (9) グルコースに対するKm値

前記活性測定法に準じ、基質であるD-グルコース濃度を変化させて、各GLDの活性を測定した。5、15、25及び50mMの各グルコース濃度における活性測定値からHanes-Woolfプロットによりミカエリス定数(K_m値)を求めた結果、ApsGLDは8.78mM、ApnGLDは11.5mM、KcGLDは21.6mM、KzGLDは37.3mM、Cs7GLDは13.0mM、FcGLDは16.8mMだった。尚、K_m値は、測定方法や算出するプロットによって値が変動し易いため、ApsGLDは約5~20mM、ApnGLDは約5~20mM、KcGLDは約10~50mM、KzGLDは約10~60mM、Cs7GLDは約5~30mM、FcGLDは約5~30mMと考えられる。

[0131] [実施例14]

(本発明のGLDによるグルコースの測定)

本発明のGLDを用いて、前記活性測定法におけるD-グルコースの濃度を0.3mM(5.5mg/dL)~50mM(900mg/dL)の範囲に変化させて、吸光度変化を測定した。結果を図3に示す(図3(A)はApsGLD、図3(B)はApnGLD、図3(C)はKcGLD、図3(D)はKzGLD、図3(E)はCs7GLD、図3(F)はFcGLDを示す)。その結果、何れの本発明のGLDにおいても、900mg/dLまでのD-グルコースを測定できた。これより、本発明のGLDを用いたD-グルコースの定量が可能であることが示された。

[0132] [実施例15]

本発明の各GLDのアミノ酸配列同士(配列番号2:ApsGLD、4:ApnGLD、6:KcGLD、8:KzGLD、10:Cs7GLD、12:FcGLD、14:Cs8GLD、16:CcGLD、18:CfGLD及び20:CoGLD)をGENETYXのホモロジー検索により比較して、Similarity%の数値を類似性%として表3にまとめ、identity%の数値を同一性%として表4にまとめた。

更に、本発明の各GLDの塩基配列同士(配列番号1:ApsGLD、3

: A p n G L D、5 : K c G L D、7 : K z G L D、9 : C s 7 G L D、1
1 : F c G L D、13 : C s 8 G L D、15 : C c G L D、17 : C f G L
D及び19 : C o G L D) を G E N E T Y X の ホ モ ロ ジ ー 検 索 に よ り 比 較 し
て、i d e n t i t y % の 数 値 を 同 一 性 % と し て 表 5 に ま と め た。

[0133] [表3]

アミノ酸配列類似性(%)										
	No. 2	No. 4	No. 6	No. 8	No. 10	No. 12	No. 14	No. 16	No. 18	No. 20
	ApsGLD	ApnGLD	KcGLD	KzGLD	Cs7GLD	FcGLD	Cs8GLD	CcGLD	CfGLD	CoGLD
ApsGLD	100	98.1	96.2	97.4	93.6	94.6	94.6	94.7	93.8	94.3
ApnGLD	98.1	100	95.2	96.9	93.2	94.1	94.1	94.1	93.2	93.6
KcGLD	96.2	95.2	100	94.7	92.1	92.6	92.7	92.8	92.2	92.2
KzGLD	97.4	96.9	94.7	100	92.0	92.2	92.0	92.2	91.7	92.0
Cs7GLD	93.6	93.2	92.1	92.0	100	98.1	98.1	98.2	98.1	97.7
FcGLD	94.6	94.1	92.6	92.2	98.1	100	99.8	100	100	99.4
Cs8GLD	94.6	94.1	92.7	92.0	98.1	99.8	100	99.8	99.8	99.3
CcGLD	94.7	94.1	92.8	92.2	98.2	100	99.8	100	100	99.4
CfGLD	93.8	93.2	92.2	91.7	98.1	100	99.8	100	100	99.4
CoGLD	94.3	93.6	92.2	92.0	97.7	99.4	99.3	99.4	99.4	100

[0134] [表4]

アミノ酸配列同一性(%)										
	No. 2	No. 4	No. 6	No. 8	No. 10	No. 12	No. 14	No. 16	No. 18	No. 20
	ApsGLD	ApnGLD	KcGLD	KzGLD	Cs7GLD	FcGLD	Cs8GLD	CcGLD	CfGLD	CoGLD
ApsGLD	100	88.4	77.1	79.5	70.4	68.5	69.0	68.3	68.7	68.9
ApnGLD	88.4	100	75.4	79.8	69.9	67.8	68.2	67.8	68.3	68.3
KcGLD	77.1	75.4	100	72.9	66.0	64.6	64.6	64.3	65.1	65.0
KzGLD	79.5	79.8	72.9	100	67.0	67.0	67.5	66.6	66.8	67.0
Cs7GLD	70.4	69.9	66.0	67.0	100	84.4	84.6	84.8	84.6	84.1
FcGLD	68.5	67.8	64.6	67.0	84.4	100	95.5	95.7	96.0	94.7
Cs8GLD	69.0	68.2	64.6	67.5	84.6	95.5	100	96.5	94.8	95.3
CcGLD	68.3	67.8	64.3	66.6	84.8	95.7	96.5	100	95.3	95.9
CfGLD	68.7	68.3	65.1	66.8	84.6	96.0	94.8	95.3	100	95.0
CoGLD	68.9	68.3	65.0	67.0	84.1	94.7	95.3	95.9	95.0	100

[0135]

[表5]

塩基配列同一性(%)										
	No. 1	No. 3	No. 5	No. 7	No. 9	No. 11	No. 13	No. 15	No. 17	No. 19
	ApsGLD	ApnGLD	KcGLD	KzGLD	Cs7GLD	FcGLD	Cs8GLD	CcGLD	CfGLD	CoGLD
ApsGLD	100	80.9	78.4	77.0	67.9	68.6	68.3	68.0	68.6	68.5
ApnGLD	80.9	100	75.4	75.3	67.5	66.8	67.1	67.7	67.5	67.1
KcGLD	78.4	75.4	100	73.3	66.5	66.5	66.8	67.0	66.4	67.8
KzGLD	77.0	75.3	73.3	100	67.0	67.5	67.0	67.1	66.4	66.9
Cs7GLD	67.9	67.5	66.5	67.0	100	79.7	80.5	79.9	79.8	79.7
FcGLD	68.6	66.8	66.5	67.5	79.7	100	89.0	90.1	90.9	89.6
Cs8GLD	68.3	67.1	66.8	67.0	80.5	89.0	100	92.2	89.4	90.9
CcGLD	68.0	67.7	67.0	67.1	79.9	90.1	92.2	100	89.8	90.2
CfGLD	68.6	67.5	66.4	66.4	79.8	90.9	89.4	89.8	100	89.0
CoGLD	68.5	67.1	67.8	66.9	79.7	89.6	90.9	90.2	89.0	100

[0136] 表3の結果より、本願では、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18又は20の配列と、類似性がそれぞれ少なくとも90%のアミノ酸配列であり且つグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質、及び該タンパク質をコードするポリヌクレオチドを取得できたことが確認できた。

[0137] 表4の結果より、本願では、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18又は20の配列と、同一性がそれぞれ少なくとも60%のアミノ酸配列であり且つグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質、及び該タンパク質をコードするポリヌクレオチドを取得できたことが確認できた。

[0138] 表5の結果より、本願では、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17又は19の配列と、同一性がそれぞれ少なくとも60%の塩基配列であり且つグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドを取得できたことが確認できた。

請求の範囲

- [請求項1] 下記の性質（１）～（３）を有するフラビン結合型グルコースデヒドロゲナーゼ：
- （１）作用：電子受容体存在下でグルコースデヒドロゲナーゼ活性を示す；
- （２）基質特異性：D-グルコースに対する活性値を100%とした場合のマルトース、D-ガラクトース、D-フルクトース、ソルビトール、ラクトース及びスクロースに対する活性値が10%以下である；
- （３）温度特性：30℃における活性値を100%とした場合に、10～40℃における活性値の範囲が20～150%である。
- [請求項2] 酵素タンパクのポリペプチドの分子量が60～70kDaである請求項1記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。
- [請求項3] 至適温度が30～40℃である請求項1又は2記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。
- [請求項4] 糸状菌由来である請求項1～3の何れか1項記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。
- [請求項5] クロイボタケ綱（*D o t h i d e o m y c e t e s*）に属する糸状菌由来である請求項1～4の何れか1項記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。
- [請求項6] 糸状菌に属するグルコースデヒドロゲナーゼ生産菌を培養し、培養物からグルコースデヒドロゲナーゼを採取することを特徴とする請求項1～5の何れか1項記載のグルコースデヒドロゲナーゼの製造方法。
- [請求項7] グルコースデヒドロゲナーゼ活性を有し、以下の（a）、（b）又は（c）のタンパク質からなるグルコースデヒドロゲナーゼ：
- （a）配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18又は20に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質、

(b) 配列番号2の17～591番目、配列番号4の16～589番目、配列番号6の24～592番目、配列番号8の17～591番目、配列番号10の18～586番目、配列番号12の18～586番目、配列番号14の18～586番目、配列番号16の18～586番目、配列番号18の18～586番目又は配列番号20の18～586番目に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質、

(c) (a) 又は (b) のアミノ酸配列と少なくとも90%の類似性を有するアミノ酸配列を有し、グルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質。

[請求項8] 以下の(e)、(f)、(g)又は(h)からなるポリヌクレオチド：

(e) 配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17又は19に示される塩基配列を有するポリヌクレオチド、

(f) 配列番号1の49～1773番目、配列番号3の46～1767番目、配列番号5の70～1776番目、配列番号7の49～1773番目、配列番号9の位置52～1758番目、配列番号11の52～1758番目、配列番号13の52～1758番目、配列番号15の52～1758番目、配列番号17の52～1758番目又は配列番号19の52～1758番目に示される塩基配列を有するポリヌクレオチド、

(g) (e) 又は (f) のポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド、

(h) (a) ～ (c) に記載のタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

[請求項9] 請求項8に記載のポリヌクレオチドを含む組換えベクター。

[請求項10] 請求項8に記載のポリヌクレオチドを含む形質転換細胞。

[請求項11] 請求項10に記載の細胞を培養し、培養物からグルコースデヒドロゲ

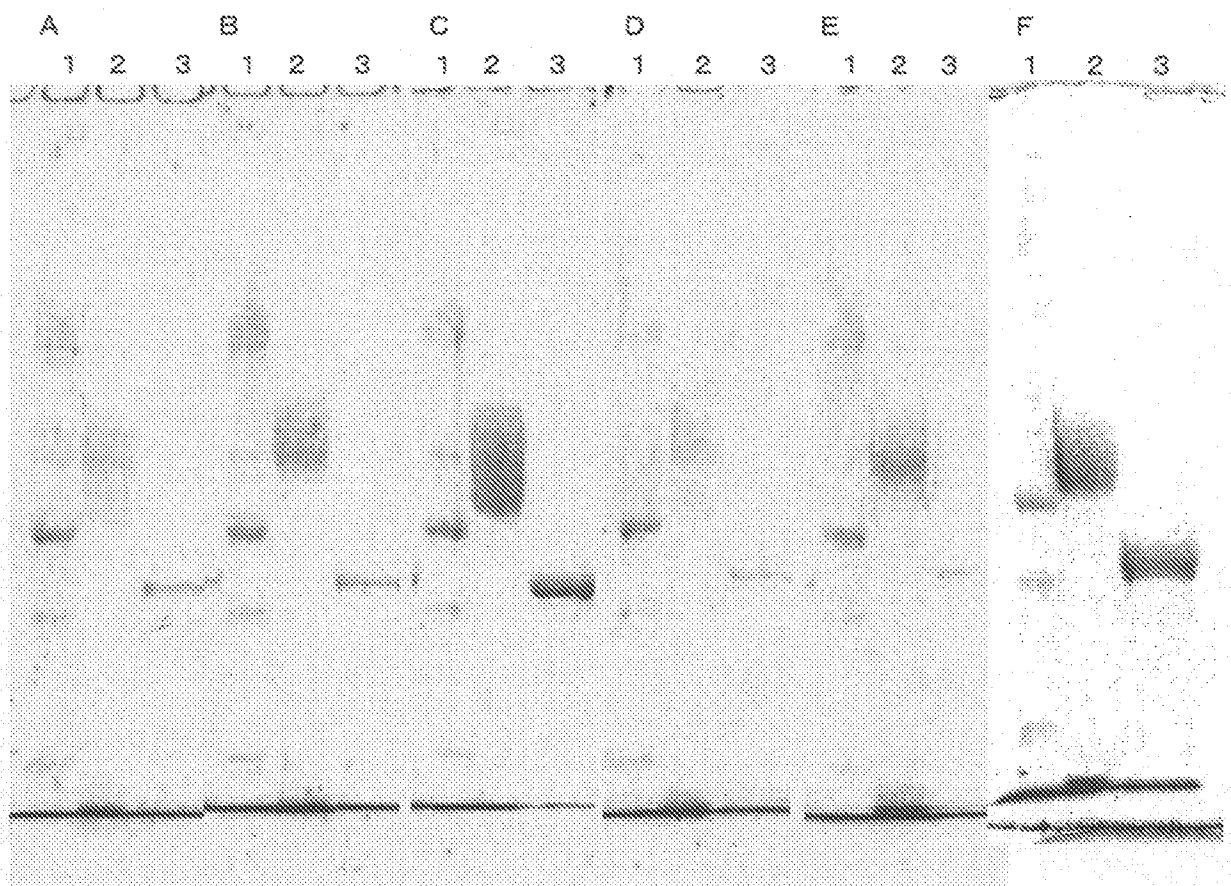
ナーゼを採取することを特徴とするグルコースデヒドロゲナーゼの製造方法。

[請求項12] 被検試料と請求項1～5若しくは請求項7の何れか1項記載のグルコースデヒドロゲナーゼ又は請求項6若しくは請求項11に記載の方法で製造されたグルコースデヒドロゲナーゼを使用するグルコースの測定方法。

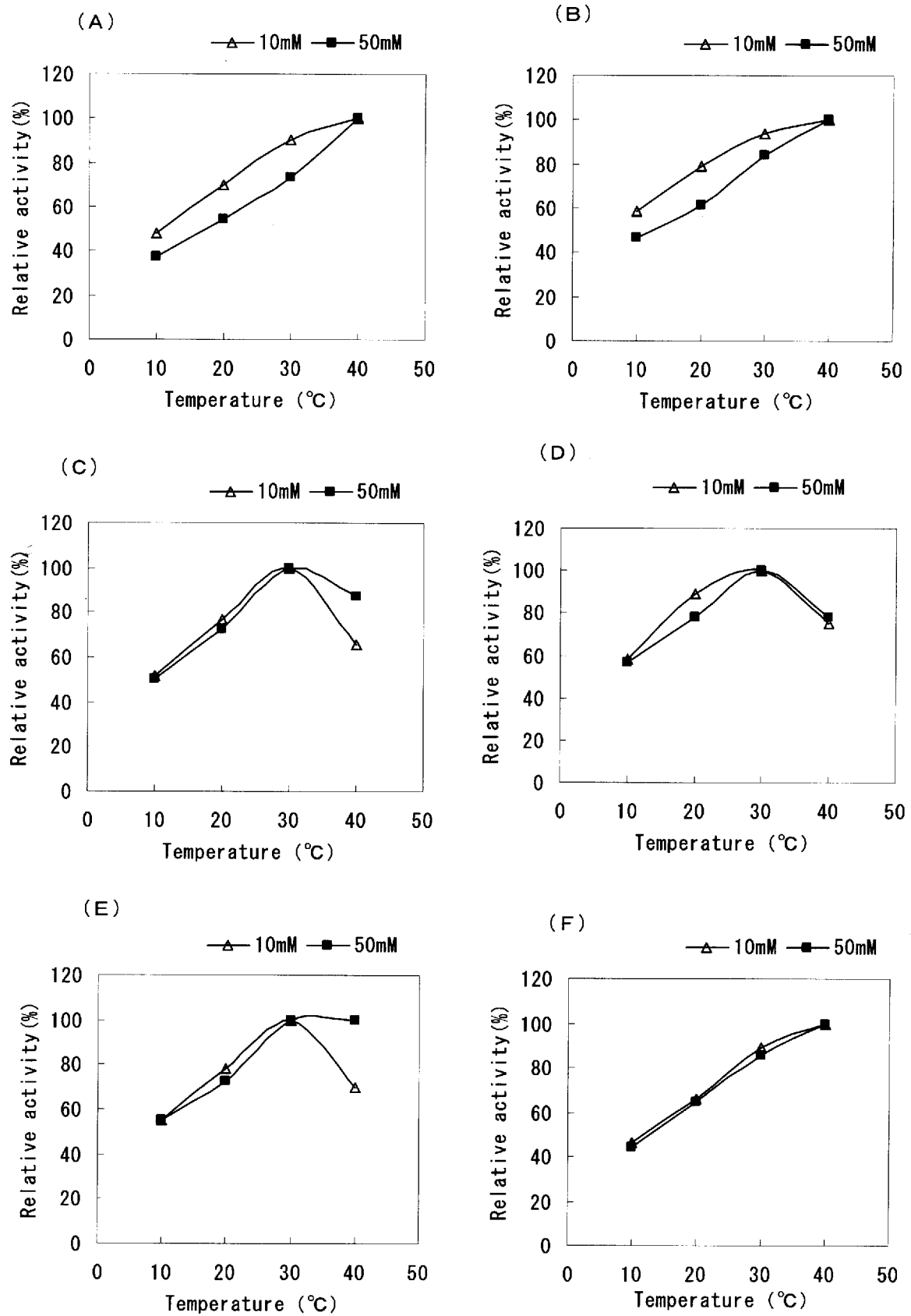
[請求項13] 請求項1～5若しくは請求項7の何れか1項記載のグルコースデヒドロゲナーゼ又は請求項6若しくは請求項11に記載の方法で製造されたグルコースデヒドロゲナーゼを含有するグルコース測定試薬。

[請求項14] 請求項1～5若しくは請求項7の何れか1項記載のグルコースデヒドロゲナーゼ又は請求項6若しくは請求項11に記載の方法で製造されたグルコースデヒドロゲナーゼを使用するグルコース測定用バイオセンサー。

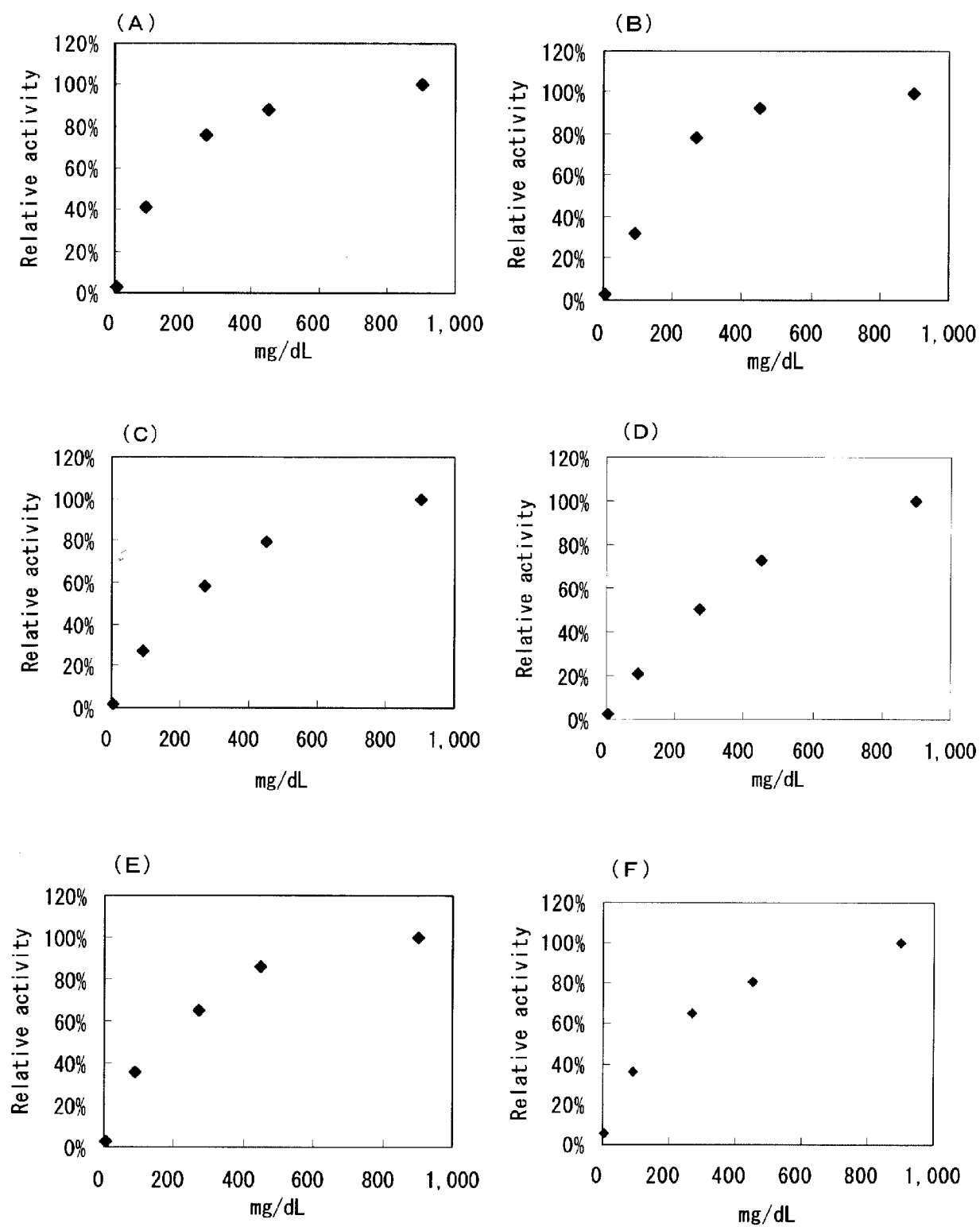
[図1]



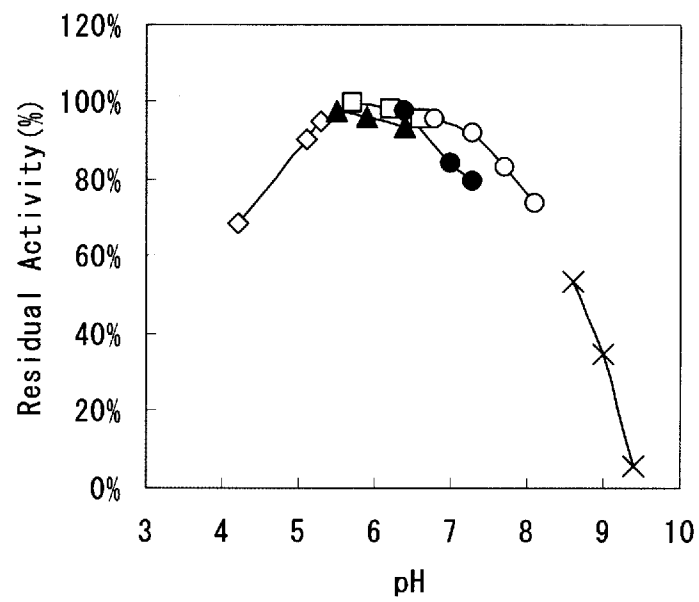
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/059639

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/00(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, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/32(2006.01)i, C12Q1/54(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/00, C12M1/34, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/04, C12N15/09, C12Q1/32, C12Q1/54

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013
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)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN),
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2010-57427 A (Toyobo Co., Ltd.), 18 March 2010 (18.03.2010), claims; paragraph [0066] (Family: none)	1-14
A	WO 2009/087929 A1 (Toyobo Co., Ltd.), 16 July 2009 (16.07.2009), claims; paragraph [0088] & US 2011/20851 A1 & EP 2230301 A1 & CN 101918553 A	1-14
A	WO 2010/140431 A1 (Kikkoman Corp.), 09 December 2010 (09.12.2010), claims; paragraph [0065] & US 2011/318810 A1 & EP 2348108 A1 & CN 102292439 A & KR 10-2011-50752 A	1-14

☒ 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
23 April, 2013 (23.04.13)

Date of mailing of the international search report
14 May, 2013 (14.05.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/059639

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2011-217755 A (Ikeda Food Research Co., Ltd.), 04 November 2011 (04.11.2011), entire text & WO 2008/001903 A1 & US 2011/33880 A1	1-14
A	JP 2011-103792 A (Toyobo Co., Ltd.), 02 June 2011 (02.06.2011), paragraph [0092] (Family: none)	1-14
A	WO 2006/101239 A1 (Ikeda Food Research Co., Ltd.), 28 September 2006 (28.09.2006), claims; paragraph [0057] & US 2012/122130 A1 & EP 2380981 A1 & CN 101160397 A & CA 2604507 A	1-14
P,X	WO 2013/031664 A1 (Ikeda Food Research Co., Ltd.), 07 March 2013 (07.03.2013), entire text (Family: none)	1-4,6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/00(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, C12N15/09(2006.01)i,
C12Q1/32(2006.01)i, C12Q1/54(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/00, C12M1/34, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/04, C12N15/09, C12Q1/32, C12Q1/54

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 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)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2010-57427 A (東洋紡績株式会社) 2010.03.18, 特許請求の範囲, 0066 欄 (ファミリーなし)	1 - 1 4
A	WO 2009/087929 A1 (東洋紡績株式会社) 2009.07.16, 特許請求の範 囲, 0088 欄 & US 2011/20851 A1 & EP 2230301 A1 & CN 101918553 A	1 - 1 4
A	WO 2010/140431 A1 (キッコーマン株式会社) 2010.12.09, 特許請求 の範囲, 0065 欄 & US 2011/318810 A1 & EP 2348108 A1 & CN 102292439 A & KR 10-2011-50752 A	1 - 1 4

☒ 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

2 3 . 0 4 . 2 0 1 3

国際調査報告の発送日

1 4 . 0 5 . 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	JP 2011-217755 A (池田食研株式会社) 2011.11.04, 全文 & WO 2008/001903 A1 & US 2011/33880 A1	1 - 1 4
A	JP 2011-103792 A (東洋紡績株式会社) 2011.06.02, 0092 欄 (ファミリーなし)	1 - 1 4
A	WO 2006/101239 A1 (池田食研株式会社) 2006.09.28, 特許請求の範囲, 0057 欄 & US 2012/122130 A1 & EP 2380981 A1 & CN 101160397 A & CA 2604507 A	1 - 1 4
P, X	WO 2013/031664 A1 (池田食研株式会社) 2013.03.07, 全文 (ファミリーなし)	1 - 4, 6