

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-163185

(P2007-163185A)

(43) 公開日 平成19年6月28日(2007.6.28)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 27/327 (2006.01)	GO 1 N 27/30 3 5 3 U	4 B O 2 4
HO 1 M 8/16 (2006.01)	GO 1 N 27/30 3 5 3 R	4 B O 2 9
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	HO 1 M 8/16 Z N A	4 B O 5 0
C 1 2 M 1/40 (2006.01)	C 1 2 M 1/34 E	
C 1 2 N 9/02 (2006.01)	C 1 2 M 1/40 B	

審査請求 未請求 請求項の数 23 O L (全 87 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2005-356930 (P2005-356930)	(71) 出願人	000001007 キヤノン株式会社 東京都大田区下丸子3丁目30番2号
(22) 出願日	平成17年12月9日 (2005.12.9)	(74) 代理人	100123788 弁理士 宮崎 昭夫
		(74) 代理人	100106138 弁理士 石橋 政幸
		(74) 代理人	100120628 弁理士 岩田 慎一
		(74) 代理人	100127454 弁理士 緒方 雅昭
		(72) 発明者	野本 毅 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酵素電極

(57) 【要約】

【課題】高い感度のセンサーや、高い出力のバイオ燃料電池、高い反応効率の電気化学反応装置として利用することが可能な酵素電極を提供する

【解決手段】導電性基体と、該導電性基体に固定された融合タンパク質および電子伝達メディエーターとを有し、該融合タンパク質が反応基質1から反応生成物1を生じる化学反応を触媒する酵素1と反応基質2から反応生成物2を生じる化学反応を触媒する酵素2との融合タンパク質であり、反応生成物1の少なくとも一つの化学物質が反応基質2の少なくとも一つの化学物質と同一であること、を特徴とする酵素電極。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

導電性基体と、該導電性基体と電氣的に接続される酵素とを有する酵素電極において、前記酵素は、第 1 の反応基質から第 1 の反応生成物を生じる化学反応を触媒する第 1 の酵素と、第 2 の反応基質から第 2 の反応生成物を生じる化学反応を触媒する第 2 の酵素との融合タンパク質からなり、且つ該第 1 の反応生成物の少なくとも一部が、該第 2 の反応基質の少なくとも一部と同一であることを特徴とする酵素電極。

【請求項 2】

前記酵素は、前記導電性基体に、電子伝達メディエータと共に固定化されている請求項 1 記載の酵素電極。

10

【請求項 3】

前記第 1 の酵素がデヒドロゲナーゼであり、且つ前記第 2 の酵素がジアフォラーゼである請求項 1 に記載の酵素電極。

【請求項 4】

前記デヒドロゲナーゼが、グルコースデヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、アルデヒドデヒドロゲナーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ及びグルタミン酸デヒドロゲナーゼから選ばれる請求項 3 に記載の酵素電極。

【請求項 5】

前記第 1 の酵素がアルコールデヒドロゲナーゼであり、且つ前記第 2 の酵素がアルデヒドデヒドロゲナーゼであり、且つジアフォラーゼを有する請求項 1 に記載の酵素電極。

20

【請求項 6】

前記第 1 の酵素がイソメラーゼであり、且つ前記第 2 の酵素がグルコースデヒドロゲナーゼであり、且つジアフォラーゼを有する請求項 1 に記載の酵素電極。

【請求項 7】

前記デヒドロゲナーゼとジアフォラーゼとの融合タンパク質が、以下の (a) または (b) のアミノ酸配列を有し、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性およびジアフォラーゼ活性を有することを特徴とする請求項 1 から 4 のいずれかに記載の酵素電極；

(a) 配列番号 1 1 で表されるアミノ酸配列、

(b) 配列番号 1 1 で表されるアミノ酸配列において、前記の各活性が損なわれない範囲で、1 から複数個のアミノ酸の付加、欠失、置換などの修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。

30

【請求項 8】

前記デヒドロゲナーゼとジアフォラーゼとの融合タンパク質が、以下の (a) または (b) のアミノ酸配列を有し、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性およびジアフォラーゼ活性を有することを特徴とする請求項 1 から 4 のいずれかに記載の酵素電極；

(a) 配列番号 2 3 で表されるアミノ酸配列、

(b) 配列番号 2 3 で表されるアミノ酸配列において、前記の各活性が損なわれない範囲で、1 から複数個のアミノ酸の付加、欠失、置換などの修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。

【請求項 9】

前記デヒドロゲナーゼとジアフォラーゼとの融合タンパク質が、以下の (a) または (b) のアミノ酸配列を有し、かつアルコールデヒドロゲナーゼ活性およびジアフォラーゼ活性を有することを特徴とする請求項 1 から 4 のいずれかに記載の酵素電極；

(a) 配列番号 3 5 で表されるアミノ酸配列、

(b) 配列番号 3 5 で表されるアミノ酸配列において、前記の各活性が損なわれない範囲で、1 から複数個のアミノ酸の付加、欠失、置換などの修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。

40

【請求項 10】

前記デヒドロゲナーゼとジアフォラーゼとの融合タンパク質が、以下の (a) または (b) のアミノ酸配列を有し、かつアルコールデヒドロゲナーゼ活性およびジアフォラーゼ

50

活性を有することを特徴とする請求項 1 から 4 のいずれかに記載の酵素電極；

(a) 配列番号 4 4 で表されるアミノ酸配列、

(b) 配列番号 4 4 で表されるアミノ酸配列において、前記の各活性が損なわれない範囲で、1 から複数個のアミノ酸の付加、欠失、置換などの修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。

【請求項 1 1】

前記デヒドロゲナーゼとジアフォラーゼとの融合タンパク質が、以下の (a) または (b) のアミノ酸配列を有し、かつ乳酸デヒドロゲナーゼ活性およびジアフォラーゼ活性を有することを特徴とする請求項 1 から 4 のいずれかに記載の酵素電極；

(a) 配列番号 5 7 で表されるアミノ酸配列、

(b) 配列番号 5 7 で表されるアミノ酸配列において、前記の各活性が損なわれない範囲で、1 から複数個のアミノ酸の付加、欠失、置換などの修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。

【請求項 1 2】

前記デヒドロゲナーゼとジアフォラーゼとの融合タンパク質が、以下の (a) または (b) のアミノ酸配列を有し、かつ乳酸デヒドロゲナーゼ活性およびジアフォラーゼ活性を有することを特徴とする請求項 1 から 4 のいずれかに記載の酵素電極；

(a) 配列番号 6 9 で表されるアミノ酸配列、

(b) 配列番号 6 9 で表されるアミノ酸配列において、前記の各活性が損なわれない範囲で、1 から複数個のアミノ酸の付加、欠失、置換などの修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。

【請求項 1 3】

前記デヒドロゲナーゼとジアフォラーゼとの融合タンパク質が、以下の (a) または (b) のアミノ酸配列を有し、かつリンゴ酸デヒドロゲナーゼ活性およびジアフォラーゼ活性を有することを特徴とする請求項 1 から 4 のいずれかに記載の酵素電極；

(a) 配列番号 7 9 で表されるアミノ酸配列、

(b) 配列番号 7 9 で表されるアミノ酸配列において、前記の各活性が損なわれない範囲で、1 から複数個のアミノ酸の付加、欠失、置換などの修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。

【請求項 1 4】

前記デヒドロゲナーゼとジアフォラーゼとの融合タンパク質が、以下の (a) または (b) のアミノ酸配列を有し、かつリンゴ酸デヒドロゲナーゼ活性およびジアフォラーゼ活性を有することを特徴とする請求項 1 から 4 のいずれかに記載の酵素電極；

(a) 配列番号 8 8 で表されるアミノ酸配列、

(b) 配列番号 8 8 で表されるアミノ酸配列において、前記の各活性が損なわれない範囲で、1 から複数個のアミノ酸の付加、欠失、置換などの修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。

【請求項 1 5】

前記デヒドロゲナーゼとジアフォラーゼとの融合タンパク質が、以下の (a) または (b) のアミノ酸配列を有し、かつグルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性およびジアフォラーゼ活性を有することを特徴とする請求項 1 から 4 のいずれかに記載の酵素電極；

(a) 配列番号 9 7 で表されるアミノ酸配列、

(b) 配列番号 9 7 で表されるアミノ酸配列において、前記の各活性が損なわれない範囲で、1 から複数個のアミノ酸の付加、欠失、置換などの修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。

【請求項 1 6】

前記デヒドロゲナーゼとジアフォラーゼとの融合タンパク質が、以下の (a) または (b) のアミノ酸配列を有し、かつグルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性およびジアフォラーゼ活性を有することを特徴とする請求項 1 から 4 のいずれかに記載の酵素電極；

(a) 配列番号 1 0 6 で表されるアミノ酸配列、

10

20

30

40

50

(b) 配列番号 106 で表されるアミノ酸配列において、前記の各活性が損なわれない範囲で、1 から複数個のアミノ酸の付加、欠失、置換などの修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。

【請求項 17】

前記アルコールデヒドロゲナーゼとアルデヒドデヒドロゲナーゼとの融合タンパク質が、以下の (a) または (b) のアミノ酸配列を有し、かつアルコールデヒドロゲナーゼ活性およびアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有する請求項 5 に記載の酵素電極；

(a) 配列番号 114 で表されるアミノ酸配列、

(b) 配列番号 114 で表されるアミノ酸配列において、前記の各活性が損なわれない範囲で、1 から複数個のアミノ酸の付加、欠失、置換などの修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。

10

【請求項 18】

前記アルコールデヒドロゲナーゼとアルデヒドデヒドロゲナーゼとの融合タンパク質が、以下の (a) または (b) のアミノ酸配列を有し、かつアルコールデヒドロゲナーゼ活性およびアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有する請求項 5 に記載の酵素電極；

(a) 配列番号 121 で表されるアミノ酸配列、

(b) 配列番号 121 で表されるアミノ酸配列において、前記の各活性が損なわれない範囲で、1 から複数個のアミノ酸の付加、欠失、置換などの修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。

20

【請求項 19】

前記イソメラーゼとグルコースデヒドロゲナーゼとの融合タンパク質が、以下の (a) または (b) のアミノ酸配列を有し、かつイソメラーゼ活性およびグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有する請求項 6 に記載の酵素電極；

(a) 配列番号 128 で表されるアミノ酸配列、

(b) 配列番号 128 で表されるアミノ酸配列において、前記の各活性が損なわれない範囲で、1 から複数個のアミノ酸の付加、欠失、置換などの修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。

【請求項 20】

前記イソメラーゼとグルコースデヒドロゲナーゼとの融合タンパク質が、以下の (a) または (b) のアミノ酸配列を有し、かつイソメラーゼ活性およびグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有する請求項 6 に記載の酵素電極；

(a) 配列番号 135 で表されるアミノ酸配列、

(b) 配列番号 135 で表されるアミノ酸配列において、前記の各活性が損なわれない範囲で、1 から複数個のアミノ酸の付加、欠失、置換などの修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。

30

【請求項 21】

請求項 1 乃至 20 のいずれかに記載の酵素電極を、物質を検知するための検知部位として用いることを特徴とするセンサ。

【請求項 22】

請求項 1 乃至 20 のいずれかに記載の酵素電極を、アノードとして用いることを特徴とする燃料電池。

40

【請求項 23】

請求項 1 乃至 20 のいずれかに記載の酵素電極を、反応極として用いることを特徴とする電気化学反応装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はバイオセンサーやバイオ燃料電池、電気化学反応装置の電極として利用可能な酵素電極に関する。

50

【背景技術】

【0002】

生細胞内で作られるタンパク質性の生体触媒である酵素は、通常の触媒と比べて温和な条件下で強力に作用する。また、酵素の作用を受けて化学反応を起こす物質である基質の特異性が高く、一般に各酵素は、一定基質の一定反応のみを触媒する。酵素、特に酸化還元酵素におけるこれらの特性を、電極における酸化還元反応に理想的に利用できれば、低過電圧、高選択性の電極が作成可能となる。

【0003】

酵素電極における低過電圧な電子伝達反応を達成するための技術として、関連した反応に参与する2つの酵素を用いる構成が提案されている。すなわち、反応基質1から反応生成物1を生じる反応を触媒する酵素1と反応基質2から反応生成物2を生じる反応を触媒する酵素2とを同時に用いた電極であって、反応生成物1の一部が反応基質2の一部を含むような酵素電極が提案されている。

10

【0004】

このような電極として例えば次に挙げる例を挙げるができる。

【0005】

伊倉ら(特許文献1)は、ジアフォラーゼ、デヒドロゲナーゼおよびニコチンアミド-アデニンジヌクレオチドシンターゼを含む反応層の少なくとも一部を作用電極上に形成し、これらの酵素が作用電極の表面に固定されている酵素電極を開示した。

【特許文献1】特開2003-279525号公報

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

上述したとおり、反応基質1から反応生成物1を生じる化学反応を触媒する酵素1と反応基質2から反応生成物2を生じる化学反応を触媒する酵素2とを同じ反応層において用いる酵素電極が知られている。この酵素電極では、反応基質1から電極までの低過電圧な電子伝達反応を行う上で熱力学的に有利である。しかし、酵素1と酵素2の相対的距離や配向はランダムであり、酵素1により生じた反応生成物1の一部が酵素2の反応基質2の一部として利用されるまでの拡散過程が律速段階になる。そのために、反応基質1から電極までの全体の電子伝達反応は、反応速度や低濃度の基質存在下での反応効率の面で最適化されているとはいえない。すなわち、従来この電極をセンサーとして用いた場合には反応基質1の酸化反応に伴って電極で観測される電流の測定値が小さく反応基質1に対する感度が低いという課題があった。

30

【0007】

上記の2つの酵素を用いた酵素電極をバイオ燃料電池の電極として用いた場合には、電池としての出力が小さく、また出力低下が早いという課題があった。

【0008】

なお、センサーとしての感度を向上させるために、またバイオ燃料電池の出力を向上させるために、酵素1と酵素2の濃度を高くして同じ反応層に含有させることが通常考えられる。この場合、高価な酵素を大量に使用しなければならず、酵素電極自体のコストを高くさせる要因となっていた。

40

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明の第1の骨子は、

導電性基体と、該導電性基体と電氣的に接続される酵素とを有する酵素電極において、前記酵素は、第1の反応基質から第1の反応生成物を生じる化学反応を触媒する第1の酵素と、

第2の反応基質から第2の反応生成物を生じる化学反応を触媒する第2の酵素との融合タンパク質からなり、

且つ該第1の反応生成物の少なくとも一部が、該第2の反応基質の少なくとも一部と同

50

一であることを特徴とする。

【0010】

前記酵素は、前記導電性基体に、電子伝達メディエータと共に固定化されている構成が好ましい。

【0011】

本発明の第2の骨子は、センサに関し、上記構成の酵素電極を、物質を検知するための検知部位として用いることを特徴とする。

【0012】

本発明の第3の骨子は、燃料電池に関し、本発明の燃料電池は、上記構成の酵素電極を、アノードとして用いることを特徴とする。

【0013】

本発明の第4の骨子は、電気化学反応装置に関し、本発明の電気化学反応装置は、上記構成の酵素電極を、反応極として用いることを特徴とする。

【発明の効果】

【0014】

本発明の酵素電極では、融合タンパク質を構成する酵素1と酵素2との相対的距離が近接しており、酵素1の反応基質1から電極までの電子伝達反応が効率的に進行する。

【0015】

このため、本発明の酵素電極を用いたセンサーにおいては基質の酸化に伴う電流値が大きく感度が高い。また本発明の酵素電極を用いた燃料電池においては、高い電流値を取り出すことができる。さらに本発明の酵素電極を用いた電気化学反応装置においては、高い反応効率を示す。

【0016】

また好熱菌由来の酵素を利用した場合の本発明の酵素電極は、従来の酵素電極に比較して保存安定性に優れている。

【0017】

また好熱菌由来の酵素を利用した場合の本発明の酵素電極を用いたセンサー、燃料電池、および電気化学反応装置は、高温で動作可能であり、高温で動作させることによって、拡散律速過程が加速され、より大きな感度、出力を得ることができる。

【0018】

さらに本発明の酵素電極に用いられる酸化還元酵素はクロマトグラフィーなど煩雑な操作を必要とせず、加温という簡便な操作で、高純度にまで精製が可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0019】

本発明の酵素電極は、導電性基体と、導電性基体に固定された酵素と、電子伝達メディエータとを有して構成されている。なお、導電性基体に酵素を固定化することと、電子伝達メディエータとを用いることは必要に応じて行えばよく、本発明の必須の構成ではない。

【0020】

本発明は、以下の関係を有する2つの酵素1及び2を融合させた融合タンパク質を少なくとも含有する。

(A) 酵素1は反応基質1から反応生成物1を生じる反応を触媒する。

(B) 酵素2は反応基質2から反応生成物2を生じる反応を触媒する。

(C) 反応生成物1が反応基質2となる(反応基質2となる反応生成物1は1種の化合物であっても、2種以上の化合物であってもよい)。

【0021】

融合する酵素の好ましい組合せとしては、以下の各組合せを挙げることができる。

(1) デヒドロゲナーゼ(酵素1)とジアフォルナーゼ(酵素2)の組合せ。

この場合、デヒドロゲナーゼとしては、グルコースデヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼまたはグルタミン酸デヒ

10

20

30

40

50

ドロゲナーゼが好ましい。更に、

(2) アルコールデヒドロゲナーゼ(酵素1)とアルデヒドデヒドロゲナーゼ(酵素2)の組合せ。

【0022】

この場合、導電性基体上にジアフォラーゼを共存させて固定化することが好ましい。

(3) イソメラーゼ(酵素1)とグルコースデヒドロゲナーゼ(酵素2)の組合せ。

この場合、導電性基体上にジアフォラーゼを共存させて固定化することが好ましい。

【0023】

より好ましい融合タンパク質としては以下のものを挙げるができる。

【0024】

イ)以下の(a)、(b)、(c)または(d)のアミノ酸配列とを有し、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性およびジアフォラーゼ活性を有する融合タンパク質。

(a) 配列番号11で表されるアミノ酸配列。

(b) 配列番号11で表されるアミノ酸配列において、上記の各活性が損なわれない範囲内で、1から複数個のアミノ酸の付加、欠失、置換などの修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。

(c) 配列番号23で表されるアミノ酸配列。

(d) 配列番号23で表されるアミノ酸配列において1から複数個のアミノ酸の付加、欠失、置換などの修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。

【0025】

ロ)以下の(e)、(f)、(g)または(h)のアミノ酸配列とを有し、かつアルコールデヒドロゲナーゼ活性およびジアフォラーゼ活性を有する融合タンパク質。

(e) 配列番号35で表されるアミノ酸配列。

(f) 配列番号35で表されるアミノ酸配列において、上記の各活性が損なわれない範囲内で、1から複数個のアミノ酸の付加、欠失、置換などの修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。

(g) 配列番号44で表されるアミノ酸配列。

(h) 配列番号44で表されるアミノ酸配列において、上記の各活性が損なわれない範囲内で、1から複数個のアミノ酸の付加、欠失、置換などの修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。

【0026】

ハ)以下の(i)、(j)、(k)または(l)のアミノ酸配列とを有し、かつ乳酸デヒドロゲナーゼ活性およびジアフォラーゼ活性を有する融合タンパク質。

(i) 配列番号57で表されるアミノ酸配列。

(j) 配列番号57で表されるアミノ酸配列において、上記の各活性が損なわれない範囲内で、1から複数個のアミノ酸の付加、欠失、置換などの修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。

(k) 配列番号69で表されるアミノ酸配列。

(l) 配列番号69で表されるアミノ酸配列において、上記の各活性が損なわれない範囲内で、1から複数個のアミノ酸の付加、欠失、置換などの修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。

【0027】

ニ)以下の(m)、(n)、(o)または(p)のアミノ酸配列とを有し、かつリンゴ酸デヒドロゲナーゼ活性およびジアフォラーゼ活性を有する融合タンパク質。

(m) 配列番号79で表されるアミノ酸配列。

(n) 配列番号79で表されるアミノ酸配列において、上記の各活性が損なわれない範囲内で、1から複数個のアミノ酸の付加、欠失、置換などの修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。

(o) 配列番号88で表されるアミノ酸配列。

(p) 配列番号88で表されるアミノ酸配列において、上記の各活性が損なわれない範囲

10

20

30

40

50

内で、1から複数個のアミノ酸の付加、欠失、置換などの修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。ホ)以下の(q)、(r)、(s)または(t)のアミノ酸配列とを有し、かつグルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性およびジアフォラーゼ活性を有する融合タンパク質。

(q) 配列番号97で表されるアミノ酸配列。

(r) 配列番号97で表されるアミノ酸配列において、上記の各活性が損なわれない範囲内で、1から複数個のアミノ酸の付加、欠失、置換などの修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。

(s) 配列番号106で表されるアミノ酸配列。

(t) 配列番号106で表されるアミノ酸配列において、上記の各活性が損なわれない範囲内で、1から複数個のアミノ酸の付加、欠失、置換などの修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。

10

【0028】

へ)以下の(u)、(v)、(w)または(x)のアミノ酸配列とを有し、かつアルコールデヒドロゲナーゼ活性およびアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有する融合タンパク質。

(u) 配列番号114で表されるアミノ酸配列。

(v) 配列番号114で表されるアミノ酸配列において、上記の各活性が損なわれない範囲内で、1から複数個のアミノ酸の付加、欠失、置換などの修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。

20

(w) 配列番号121で表されるアミノ酸配列。

(x) 配列番号121で表されるアミノ酸配列において、上記の各活性が損なわれない範囲内で、1から複数個のアミノ酸の付加、欠失、置換などの修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。

【0029】

ト)以下の(y)、(z)、(aa)または(ab)のアミノ酸配列とを有し、かつイソメラーゼ活性およびグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有する融合タンパク質。

(y) 配列番号128で表されるアミノ酸配列。

(z) 配列番号128で表されるアミノ酸配列において、上記の各活性が損なわれない範囲内で、1から複数個のアミノ酸の付加、欠失、置換などの修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。

30

(aa) 配列番号135で表されるアミノ酸配列。

(ab) 配列番号135で表されるアミノ酸配列において、上記の各活性が損なわれない範囲内で、1から複数個のアミノ酸の付加、欠失、置換などの修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。

【0030】

上記構成の酵素電極を用いて、センサ、燃料電池及び電気化学反応装置を構成することができる。

【0031】

本発明の酵素電極における導電性基体は、酵素電極の使用時には、外部回路と電気的に接続されるものである。この導電性基体としては、固定化酵素との界面に外部回路と電気的に接続可能な導電性の部分を少なくとも有し、かつ、保存、測定時に十分な剛性を有し、電極使用時に十分な電気化学的安定性を有するものが利用できる。

40

【0032】

導電性基体を構成し得る材料の例としては、金属、導電性高分子、金属酸化物、炭素材料を挙げることができる。

【0033】

金属の例としては、Au、Pt、Agなどのうち少なくとも一種の元素を含むものが挙げられ、これらの、合金であってもよい。また、適当な基材上にかかる金属のめっきを施して導電性基体としてもよい。

50

【0034】

導電性高分子の例としては、ポリアセチレン類、ポリアリーレン類などのうち少なくともひとつの化合物を含むものが挙げられる。

【0035】

金属酸化物の例としては、In、Sn、Zn、Ti、Al、Si、Zr、Nb、Mg、Ba、Mo、W、V、Srのうち、少なくとも一種の元素を含むものが挙げられる。金属酸化物からなる部分が導電性を有しない場合は、他の導電性材料によってこの部分に導電性を付与することができる。また、金属酸化物からなる部分が導電性を有する場合でも、他の導電性材料によってこの部分の導電性を向上させてもよい。金属酸化物に導電性を付与、あるいは、金属酸化物の導電性を向上させるための導電性材料の例としては、金属、導電性高分子、炭素材料などが挙げられる。導電性基体に用いられる炭素材料の例としては、グラファイト、カーボンブラック、カーボンナノチューブ、カーボンナノホーン、フラーレン化合物およびこれらの誘導体が挙げられる。また、炭素材料からなる部分が導電性を有しない場合は、他の導電性材料によってこの部分に導電性を付与することができる。また、炭素材料からなる部分が導電性を有する場合でも、他の導電性材料によってこの部分の導電性を向上させてもよい。

10

【0036】

導電性基体は少なくとも一部に空隙を有していてもよい。この空隙は、一次元、二次元、もしくは三次元的に連結していてもよい。一次元に連結した空隙の例としては柱状の空隙が挙げられる。二次元に連結した空隙の例としては、網状の空隙が挙げられる。、三次元に連結した空隙の例としては、スポンジ状、微小粒子を接合した後に生じる空隙、またそれらをテンプレートにして作成した構造材料の空隙が挙げられる。それらの空隙は、酵素が導入できる程度、かつ、または基質の流動、拡散が十分に行われる程度に大きく、投影面積に対する実効表面積の比が十分にえられる程度に小さいことが好ましい。空隙の平均径の例としては、5ナノメートルから、500マイクロメートルの範囲、より好ましくは、10ナノメートルから10マイクロメートルが挙げられる。また、空隙を有する導電性基体の厚さは、酵素が導電性基体の深部にまで均一に導入できる程度、かつ、または基質の流動、拡散が十分に行われる程度に小さく、導電性基体の投影面積に対する実効表面積の比が十分にえられる程度に大きいことが好ましい。この空隙を有する導電性基体の厚さの例としては、100ナノメートルから1センチメートル、より好ましくは、1マイクロメートルから5ミリメートルが挙げられる。この空隙を有する導電性基体の投影面積に対する実効表面積の比は、投影面積に対する実効表面積の比が十分にえられる程度に大きい必要がある。その例としては、10倍以上、より好ましくは、100倍以上が挙げられる。

20

30

【0037】

この空隙を有する導電性基体の気孔率は以下の要件(1)~(3)の少なくとも1つと、要件(4)とを満たすように設定されることが好ましい。

- (1) 導電性部材の投影面積に対する実効表面積の比が十分にえられる程度に大きい。
- (2) 十分な酵素、担体量が導入できる程度に大きい。
- (3) 基質の流動、拡散が充分に行われる程度に大きい。
- (4) 十分な機械的強度が得られる程度に小さい。

40

【0038】

気孔率の例としては、20%以上99%以下、より好ましくは、30%以上98%以下が挙げられる。

【0039】

多数の空隙を有する金属製導電性基体としては、発泡金属、電析金属、電解金属、焼結金属、繊維状金属、あるいは、これらの内の1種に、もしくは、複数種に該当する材料が挙げられる。

【0040】

多数の空隙を有する導電性高分子の製造方法の例としては、以下の方法等の多孔質樹脂

50

の製造に利用されている方法が例示できる。

(1) 空隙となる部分を構成する鑄型としての物質を導電性高分子中に配置して所定の形状に成形した後、鑄型としての物質を除く方法。

(2) 導電性高分子の前駆体中に空隙となる部分の鑄型としての物質を含有させ、前駆体を重合させて高分子とした後、鑄型としての物質を除く方法。

(3) 空隙となる部分を構成する鑄型となる粒子からなる層を形成し、その粒子間の空隙に高分子を充填して層を形成し、この層から粒子を除去する方法。

(4) 空隙となる部分を構成する鑄型となる粒子からなる層を形成し、その粒子間の空隙に高分子の前駆体を充填して層を形成し、前駆体を重合させて高分子層としてから粒子を除去する方法。

10

【0041】

多数の空隙を有する金属酸化物の製造方法の例としては、電析、スパッタリング、焼結、化学気相成長法(CVD)、電解およびこれらの組合せなどの方法を挙げることができる。

【0042】

多数の空隙を有する炭素材料の製造方法の例としては、グラファイト、カーボンブラック、カーボンナノチューブ、カーボンナノホーン、フラーレン化合物、およびこれらの誘導体からなる繊維や粒子などを所定の形状に成形してから焼結する方法を挙げることができる。

【0043】

本発明の酵素電極において酵素は、導電性基体に近接して固定される。すなわち、導電性基体の導電性を有する面上に直接固定化酵素層が積層される。このように導電性基体上に直接固定化酵素層が形成されることで、融合タンパク質および電子伝達メディエーターを導電性基体の物理的近傍に捕捉することができる。その結果、電子伝達メディエーターを介した酵素と導電性基体間の速やかな電子伝達反応を促進させ、更に融合タンパク質や電子伝達メディエーターの導電性基体近傍からの散逸を防止することができる。更に、かかる構成によって、酵素電極の繰返し使用を可能にするとともに、酵素電極の耐久性を向上させることができる。

20

【0044】

酵素の固定化は、融合タンパク質を導電性基体の物理的近傍に捕捉するために用いられる当業者にとって公知の方法によって作製しうるものである。固定化酵素層を作製する具体的方法として、例えば以下に述べる(1)から(6)の方法を挙げることができる。

30

(1) 共有結合法

導電性基体表面に直接官能基を導入し、この官能基と酵素とを共有結合させて酵素を固定化する。あるいは、導電性基体に接触して配置した担体に官能基を導入し、この官能基と酵素とを共有結合させて酵素を固定化する。

【0045】

このような共有結合に利用できる官能基として例えば、ヒドロキシル基、カルボキシル基、アミノ基等を挙げることができる。

【0046】

また、アルキルチオールのチオール基が金などの金属に作用して結合し容易に単分子膜(自己組織化単分子膜)を形成できることを利用し、アルキルチオールのアルキル基に予め導入した官能基を介して共有結合により酵素を金属に結合させて酵素を固定化する。

40

【0047】

アルキルチオールのアルキル基に予め導入した官能基と酵素との共有結合は、例えば二官能性試薬を用いて形成することができる。代表的な二官能性試薬としては、グルタルアルデヒド、過ヨウ素酸、等が挙げられる。

【0048】

また導電性基体に接触して配置する担体としてはアガロース、アガロース分解物、カラギーナン、寒天、アルギン酸、ポリアクリルアミド、ポリイソプロピルアクリルアミ

50

ド、ポリビニルアルコール、およびこれらの共重合体等が挙げられる。

【0049】

(2) 架橋法：

グルタルアルデヒド等の架橋剤を用いて、酵素間に架橋を形成して酵素同士を結合させて固定化する。また、これにゼラチンやアルブミン等のマトリックス物質を加えて酵素とマトリックス物質との間に架橋を形成することにより、酵素をマトリックス物質と共に固定化する。固定化の際にポリアリルアミンやポリリジンなどの合成高分子を共存させ、酵素固定化層の特性、すなわち膜強度、基質透過特性などを制御することもできる。

【0050】

(3) 包括法：

酵素をアガロース、アガロース分解物、 α -カラギーナン、寒天など、およびこれらの共重合体等の高分子マトリックス中に封入して酵素を固定化する。

【0051】

(4) 吸着法(その1)

導電性基体と酵素との疎水性相互作用を利用した物理吸着法により酵素を固定化する。導電性基体への酵素の物理的吸着が不可能あるいは不十分である場合には、酵素が物理的吸着を起す担体介して酵素を固定化できる。この担体としては、ポリアリルアミン、ポリリジン、ポリビニルピリジン、アミノ基で変性したデキストラン(たとえばDEAE-デキストラン)、キトサン、ポリグルタメート、ポリスチレンスルホン酸、硫酸デキストラン等のポリアニオンやポリカチオンからなる担体を用いることができる。担体と酵素との静電相互作用を利用したイオン結合法により酵素を担体に固定し、この酵素固定化担体を導電性基体に接触させ配置する。

【0052】

(5) 隔膜法：

ポリイミド膜、酢酸セルロース膜、ポリスルホン膜、パーフルオロスルホン酸の重合体膜(例えば、デュボン社製、商品名「ナフィオン」)等の透過制限膜を隔膜として用い導電性基体上の酵素溶液を被覆して固定化する。

【0053】

(6) 吸着法(その2)

遺伝子組換えタンパク質の精製を容易にするために用いられる各種のアフィニティータグを利用して固定化する。例えば、HA(ヘマグルチニン)、FLAG、Myc等のエピトプタグや、GST、マルトース結合タンパク質、ビオチン化ペプチド、オリゴヒスチジntagを利用して酵素を固定化する。

【0054】

本発明の酵素電極における酵素の固定量は、特に限定されず、広い範囲で変えることができる。

【0055】

本発明の酵素電極の有する融合タンパク質は、酵素1の酵素活性と酵素2の酵素活性を有する多機能酵素である。この融合タンパク質では、酵素1の酵素活性により生じる反応生成物1の少なくとも一つの化学物質は、酵素1の物理的近傍に存在する酵素2の反応基質として速やかに利用される。その結果、融合タンパク質による反応基質1から反応生成物2を生じる酵素活性は、酵素1と酵素2がそれぞれ切り離されて存在する場合よりも高くなる。

【0056】

酵素1と酵素2の具体的組合せは、酵素1による反応生成物1の少なくとも一つの化学物質が酵素2の反応基質2の少なくとも一つの化学物質と同一であり、酵素電極用の酵素としての活性を有するものであれば特に限定されない。

【0057】

なかでも、酵素1がデヒドロゲナーゼであり、酵素2がジアフォラーゼである場合、基質の酸化反応に伴って酵素電極で観測される電気化学的応答に対する酸素の影響を軽減す

10

20

30

40

50

ることができ好適である。また多くのデヒドロゲナーゼはニコチンアミドアデニンジヌクレオチドまたはニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸を電子および水素原子の受容体として利用している。このことから、ジアフォラーゼと融合するデヒドロゲナーゼの種類を選択することによって、検出対象に対して汎用性の高いセンサーを作製することが可能となる。このようなデヒドロゲナーゼとして例えば、グルコースデヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、コレステロールデヒドロゲナーゼ、アルデヒドデヒドロゲナーゼ、フルクトースデヒドロゲナーゼ、ソルビトールデヒドロゲナーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、グリセロールデヒドロゲナーゼ、17βヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ、エストラジオール17βデヒドロゲナーゼ、アミノ酸デヒドロゲナーゼ、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ、3-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ等を挙げることができる。

例えば、酵素1としてグルコースデヒドロゲナーゼ(GDH)を、酵素2としてジアフォラーゼ(Dp)を用いてこれらの融合タンパク質を構成要素とする酵素電極を作製した場合には、図1に示す状態を得ることができる。

【0058】

すなわち、導電性基体上には、グルコースデヒドロゲナーゼGDHとジアフォラーゼDpとの融合タンパク質および電子伝達メディエーターMedを有する酵素固定化層が接触して配置される。この酵素電極にグルコースを作用させた場合、グルコースはニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD^+)等の共存下グルコースデヒドロゲナーゼの触媒作用によって酸化される。その結果、グルコノラクトンと還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド($NADH$)を生じる。

【0059】

そして還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドは酸化型電子伝達メディエーター(Med^{ox})の存在下グルコースデヒドロゲナーゼの物理的近傍に存在するジアフォラーゼの触媒作用によって直ちに酸化される。

【0060】

その結果、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドおよび還元型の電子伝達メディエーター(Med^{red})を生じる。こうして生じる還元型の電子伝達メディエーター(Med^{red})は導電性基体に電子を伝達することが出来る。

【0061】

図1の場合、本発明の第1の骨子における、第1の反応基質が、グルコースと NAD^+ であり、第1の反応生成物質がグルコノラクトンと $NADH$ ということになる。 $NADH$ は、第2の反応基質でもある。また、 NAD^+ は、第2の反応生成物質でもある。

【0062】

すなわち、第1の反応生成物の一部である $NADH$ は、第2の反応基質の少なくとも一部と同一となっている。

【0063】

従来知られたグルコースデヒドロゲナーゼとジアフォラーゼとが個別に電極上に固定化された場合よりも、本発明の酵素電極においては、より効率の高いグルコースから電極への電子伝達が達成される。したがって、このような図1に示す酵素電極は、検出感度の高いグルコースセンサーとして、また出力の大きなグルコース燃料電池として、さらにまた反応効率の高いグルコース電気化学反応装置として利用することができる。

【0064】

特に好熱菌由来のグルコースデヒドロゲナーゼおよびジアフォラーゼの融合タンパク質を用いることによって耐熱性、耐久性、高温状態での応答性に優れた酵素電極とすることが出来る。

【0065】

酵素1としてアルコールデヒドロゲナーゼを、酵素2としてジアフォラーゼを用いて酵素電極を作製した場合には、図2に示す状態を得ることができる。すなわち、導電性基体

上に、アルコールデヒドロゲナーゼADHとジアフォルナーゼDpとの融合タンパク質および電子伝達メディエーターMedを有する酵素固定化層が接触して配置される。この酵素電極にアルコールを作用させた場合、アルコールはニコチンアミドアデニンジヌクレオチド等の共存下アルコールデヒドロゲナーゼの触媒作用によって酸化される。その結果、アルデヒドと還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを生じる。そして還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドは酸化型電子伝達メディエーターの存在下アルコールデヒドロゲナーゼの物理的近傍に存在するジアフォルナーゼの触媒作用によって直ちに酸化される。その結果、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドおよび還元型の電子伝達メディエーターを生じる。こうして生じる還元型の電子伝達メディエーターは導電性基体に電子を伝達することが出来る。

10

酵素1として乳酸デヒドロゲナーゼを、酵素2としてジアフォルナーゼを用いて酵素電極を作製した場合には、図3に示す状態を得ることが出来る。すなわち、導電性基体上に、乳酸デヒドロゲナーゼLDHとジアフォルナーゼDpとの融合タンパク質および電子伝達メディエーターMedを有する酵素固定化層が接触して配置される。この酵素電極に乳酸を作用させた場合、乳酸はニコチンアミドアデニンジヌクレオチド等の共存下乳酸デヒドロゲナーゼの触媒作用によって酸化される。その結果、ピルビン酸と還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを生じる。そして還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドは酸化型電子伝達メディエーターの存在下乳酸デヒドロゲナーゼの物理的近傍に存在するジアフォルナーゼの触媒作用によって直ちに酸化される。その結果、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドおよび還元型の電子伝達メディエーターを生じる。こうして生じる還元型の電子伝達メディエーターは導電性基体に電子を伝達することが出来る。

20

酵素1としてリンゴ酸デヒドロゲナーゼを、酵素2としてジアフォルナーゼを用いて酵素電極を作製した場合には、図4に示す状態を得ることが出来る。すなわち、導電性基体上に、リンゴ酸デヒドロゲナーゼMDHとジアフォルナーゼDpとの融合タンパク質および電子伝達メディエーターMedを有する酵素固定化層が接触して配置される。この酵素電極にリンゴ酸を作用させた場合、リンゴ酸はニコチンアミドアデニンジヌクレオチド等の共存下リンゴ酸デヒドロゲナーゼの触媒作用によって酸化される。その結果、ピルビン酸と還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを生じる。そして還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドは酸化型電子伝達メディエーターの存在下リンゴ酸デヒドロゲナーゼの物理的近傍に存在するジアフォルナーゼの触媒作用によって直ちに酸化される。その結果、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドおよび還元型の電子伝達メディエーターを生じる。こうして生じる還元型の電子伝達メディエーターは導電性基体に電子を伝達することが出来る。

30

【0066】

酵素1としてグルタミン酸デヒドロゲナーゼを、酵素2としてジアフォルナーゼを用いて酵素電極を作製した場合には、図5に示す状態を得ることが出来る。すなわち、導電性基体上に、グルタミン酸デヒドロゲナーゼEDHとジアフォルナーゼDpとの融合タンパク質および電子伝達メディエーターMedを有する酵素固定化層が接触して配置される。この酵素電極にグルタミン酸を作用させた場合、グルタミン酸はニコチンアミドアデニンジヌクレオチド等の共存下グルタミン酸デヒドロゲナーゼの触媒作用によって酸化される。その結果、2-オキソグルタル酸と還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを生じる。そして還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドは酸化型電子伝達メディエーターの存在下グルタミン酸デヒドロゲナーゼの物理的近傍に存在するジアフォルナーゼの触媒作用によって直ちに酸化される。その結果、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドおよび還元型の電子伝達メディエーターを生じる。こうして生じる還元型の電子伝達メディエーターは導電性基体に電子を伝達することが出来る。

40

【0067】

従来知られたグルタミン酸デヒドロゲナーゼとジアフォルナーゼとが個別に電極上に固定

50

化された場合よりも、本発明の酵素電極においては、より効率の高いグルタミン酸から電極への電子伝達が達成される。したがって、このような図5に示す酵素電極は、検出感度の高いグルタミン酸センサーとして、また出力の大きなグルタミン酸燃料電池として、さらにまた反応効率の高いグルタミン酸電気化学反応装置として利用することができる。

【0068】

特に好熱菌由来のグルタミン酸デヒドロゲナーゼおよびジアフォラーゼの融合タンパク質を用いることによって耐熱性、耐久性、高温状態での応答性に優れた酵素電極とすることが出来る。

【0069】

酵素1としてアルコールデヒドロゲナーゼを、酵素2としてアルデヒドデヒドロゲナーゼを用い、さらにジアフォラーゼを共存させて酵素電極を作製した場合には、図6に示す状態を得ることができる。すなわち、導電性基体上に、アルコールデヒドロゲナーゼADHとアルデヒドデヒドロゲナーゼALDHとの融合タンパク質、ジアフォラーゼDpおよび電子伝達メディエーターMedを有する酵素固定化層が接触して配置される。この酵素電極にアルコールを作用させた場合、アルコールはニコチンアミドアデニンジヌクレオチド等の共存下アルコールデヒドロゲナーゼの触媒作用によって酸化される。その結果、アルデヒドと還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを生じる。さらに生じたアルデヒドはニコチンアミドアデニンジヌクレオチド等の共存下アルコールデヒドロゲナーゼの物理的近傍に存在するアルデヒドデヒドロゲナーゼの触媒作用によって直ちに酸化される。その結果、カルボン酸と還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを生じる。このようにして生じた還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドは酸化型電子伝達メディエーターの存在下ジアフォラーゼの触媒作用によって酸化される。その結果、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドおよび還元型の電子伝達メディエーターを生じる。こうして生じる還元型の電子伝達メディエーターは導電性基体に電子を伝達することが出来る。またこの酵素電極においてはアルデヒド種が酵素電極近傍に蓄積することが防止され、アルデヒド種による酵素タンパク質の不活性化反応が軽減されるので、酵素電極の活性低下を抑えることができる。

【0070】

酵素1としてイソメラーゼを、酵素2としてグルコースデヒドロゲナーゼを用い、さらにジアフォラーゼを共存させて酵素電極を作製した場合には、図7に示す状態を得ることができる。すなわち、導電性基体上に、イソメラーゼISOとグルコースデヒドロゲナーゼGDHとの融合タンパク質、ジアフォラーゼDpおよび電子伝達メディエーターMedを有する酵素固定化層が接触して配置される。この酵素電極にフルクトースを作用させた場合、フルクトースはイソメラーゼの触媒作用によって異性化され、グルコースを生じる。生じたグルコースはニコチンアミドアデニンジヌクレオチド等の共存下イソメラーゼの物理的近傍に存在するグルコースデヒドロゲナーゼの触媒作用によって直ちに酸化される。その結果、グルコノラクトンと還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを生じる。さらに生じた還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドは酸化型電子伝達メディエーターの存在下ジアフォラーゼの触媒作用によって酸化される。その結果、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドおよび還元型の電子伝達メディエーターを生じる。こうして生じる還元型の電子伝達メディエーターは導電性基体に電子を伝達することが出来る。

本発明の酵素電極に用いられる融合タンパク質は遺伝子工学的手法を用いて製造することができる。まず、酵素1のアミノ酸配列をコードする遺伝子を有する第1のDNA配列と酵素2のアミノ酸配列をコードする遺伝子を有する第2のDNA配列を用意する。そして、第1のDNA配列と第2のDNA配列とを、これらの酵素が融合された融合タンパク質の発現を可能とする状態で結合する。例えば、第1のDNAの5'側上流または3'側下流に第2のDNA配列を連結して、融合タンパク質発現用の組換え遺伝子としてのDNA配列を得ることができる。この組換え遺伝子を適当な宿主-ベクター系に用いて発現させて、これにコードされた組換えタンパク質を得ることができる。発現した融合タンパク質を、単離、精製し

10

20

30

40

50

て、酵素電極用として利用することができる。

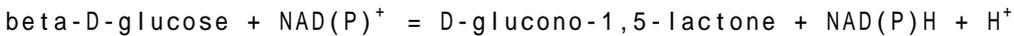
【0071】

酵素1および酵素2のアミノ酸配列をコードする遺伝子DNA配列は、その機能が同定されていれば、その由来は特に限定されない。

【0072】

融合タンパク質用のグルコースデヒドロゲナーゼ (EC1.1.1.47) としては、下記の化学反応を触媒する機能が同定されており、遺伝子の塩基配列または酵素のアミノ酸配列が既知のものであれば利用できる。すなわち、その由来は特に限定されない。

反応式1:



10

そのようなグルコースデヒドロゲナーゼ遺伝子としては、*Bacillus*属、例えば *Bacillus subtilis* 168[Nature 390:249-56 (1997)]、*Gloeobacter*属、例えば *Gloeobacter violaceus* PCC7421[DNA Res 10:137-45 (2003)]、*Thermoplasma*属、例えば *Thermoplasma acidophilum* DSM 1728[Nature 407:508-13 (2000)]、*Thermoplasma volcanium* GSS1[Proc Natl Acad Sci U S A 97:14257-62 (2000)]、*Picrophilus*属、例えば *Picrophilus torridus* DSM 9790[Proc Natl Acad Sci U S A 101:9091-6 (2004)]、*Pyrococcus*属、例えば *Pyrococcus furiosus* DSM 3638[Genetics 152:1299-305 (1999)]、*Sulfolobus*属、例えば *Sulfolobus solfataricus*[Proc Natl Acad Sci U S A 98:7835-40 (2001)]、*Sulfolobus tokodaii* strain7[DNA Res 8:123-40 (2001)]等を挙げることができ、いずれも本発明の融合タンパク質の構成要素として利用することができる。特に *Pyrococcus furiosus*、*Sulfolobus solfataricus*等由来の酵素は耐熱性があり、本発明に好適に利用し得る。

20

【0073】

融合タンパク質用のアルコールデヒドロゲナーゼ (EC1.1.1.1) としては、下記の化学反応を触媒する機能が同定されており、遺伝子の塩基配列または酵素のアミノ酸配列が既知のものであれば利用できる。すなわち、その由来は特に限定されない。

反応式2:



そのようなアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子としては、*Saccharomyces*属、例えば *Saccharomyces cerevisiae* S288C[Science 274:546-67 (1996)]、*Pseudomonas*属、例えば *Pseudomonas aeruginosa* PA01[Nature 406:959-64 (2000)]、*Pseudomonas putida* KT2440[Environ Microbiol 4:799-808 (2002)]、*Acinetobacter*属、例えば *Acinetobacter* sp. ADP1[Nucleic Acids Res 32:5766-79 (2004)]、*Bacillus*属、例えば *Bacillus subtilis* 168[Nature 390:249-56 (1997)]、*Lactococcus*属、例えば *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403[Genome Res 11:731-53 (2001)]、*Lactobacillus*属、例えば *Lactobacillus plantarum* WCFS1[Proc Natl Acad Sci U S A 100:1990-5 (2003)]、*Thermus*属、例えば *Thermus thermophilus* HB27[Nat Biotechnol 22:547-53 (2004)]、*Aquifex*属、例えば *Aquifex aeolicus* VF5[Nature 392:353-8 (1998)]、*Thermotoga*属、例えば *Thermotoga maritima* MSB8[Nature 399:323-9 (1999)]、*Methanococcus*属、例えば *Methanococcus maripaludis* S2[J Bacteriol 186:6956-69 (2004)]、*Methanosarcina*属、例えば *Methanosarcina acetivorans* C2A[Genome Res 12:532-42 (2002)]、*Methanosarcina mazei* Goe1[J Mol Microbiol Biotechnol 4:453-61 (2002)]、*Thermoplasma*属、例えば *Thermoplasma acidophilum* DSM 1728[Nature 407:508-13 (2000)]、*Thermoplasma volcanium* GSS1[Proc Natl Acad Sci U S A 97:14257-62 (2000)]、*Pyrococcus*属、例えば *Pyrococcus horikoshii* OT3[DNA Res 5:55-76 (1998)]、*Pyrococcus abyssi* GE5、*Pyrococcus furiosus* DSM 3638[Genetics 152:1299-305 (1999)]、*Mol Microbiol* 38:684-93 (2000)、*Methods Enzymol* 330:134-57 (2001)]、*Aeropyrum*属、例えば *Aeropyrum pernix* K1[DNA Res 6:83-101, 145-52 (1999)]、*Sulfolobus*属、例えば *Sulfolobus solfataricus*[Proc Natl Acad Sci U S A 98:7835-40 (2001)]、*Sulfolobus tokodaii* strain7[DNA Res 8:123-40 (2001)]、*Pyrobaculum*属、例

30

40

50

例えば *Pyrobaculum aerophilum* IM2 [Proc Natl Acad Sci U S A 99:984-9 (2002)] 等を挙げることができ、いずれも本発明の融合タンパク質の構成要素として利用することができる。特に *Corynebacterium efficiens*、*Thermus thermophilus* Aquifex aeolicus、*Thermotoga maritima*、*Archaeoglobus fulgidus*、*Pyrococcus horikoshii*、*Pyrococcus abyssi*、*Pyrococcus furiosus*、*Aeropyrum pernix*、*Pyrobaculum aerophilum* 等由来の酵素は耐熱性があり、本発明に好適に利用し得る。

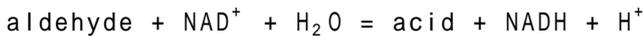
【0074】

融合タンパク質用のアルデヒドデヒドロゲナーゼとしては、下記の化学反応(1)または(2)を触媒する機能が同定されており、遺伝子の塩基配列または酵素のアミノ酸配列が既知のものであれば利用できる。すなわち、その由来は特に限定されない。

10

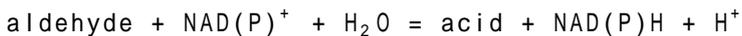
(1) 電子受容体としてNADを要求する酵素 (EC 1.2.1.3)。

反応式 3 :



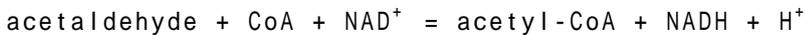
(2) 電子受容体としてNADまたはNADPを要求する酵素 (EC 1.2.1.5)。

反応式 4 :



なかでも、アセトアルデヒドを酸化するアルデヒドデヒドロゲナーゼとしては、下記の化学反応を触媒する機能が同定されており、遺伝子の塩基配列または酵素のアミノ酸配列が既知のものであれば利用できる。すなわち、その由来は特に限定されない。

反応式 5 :



20

そのようなアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子としては、電子受容体としてNADを要求するアルデヒドデヒドロゲナーゼ (EC 1.2.1.3) の場合、*Acinetobacter* 属、例えば *Acinetobacter* sp. ADP1 [Nucleic Acids Res 32:5766-79 (2004)]、*Bacillus* 属、例えば *Bacillus subtilis* 168 [Nature 390:249-56 (1997)]、*Thermus* 属、例えば *Thermus thermophilus* HB27 [Nat Biotechnol 22:547-53 (2004)]、*Pyrococcus* 属、例えば *Pyrococcus furiosus* DSM 3638 [Genetics 152:1299-305 (1999), Mol Microbiol 38:684-93 (2000), Methods Enzymol 330:134-57 (2001)]、*Aquifex* 属、例えば *Aquifex aeolicus* VF5 [Nature 392:353-8 (1998)] 等を挙げることができ、いずれも本発明の融合タンパク質の構成要素として利用することができる。

30

【0075】

また、前記電子受容体としてNADまたはNADPを要求するアルデヒドデヒドロゲナーゼ (EC 1.2.1.5) の場合、*Caenorhabditis* 属、例えば *Caenorhabditis elegans* [Science 282:2012-8 (1998)]、*Bacillus* 属、例えば *Bacillus thuringiensis* 97-27 (serovar konkukian) 等を挙げることができ、いずれも本発明の融合タンパク質の構成要素として利用することができる。

【0076】

また、前記アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ (EC 1.2.1.10) の場合、*Bacillus* 属、例えば *Bacillus cereus* ATCC 14579 [Nature 423:87-91 (2003)]、*Bifidobacterium* 属、例えば *Bifidobacterium longum* NCC2705 [Proc Natl Acad Sci U S A 99:14422-7 (2002)] 等を挙げることができ、いずれも本発明の融合タンパク質の構成要素として利用することができる。

40

【0077】

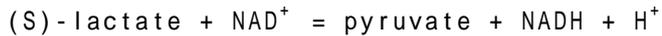
特に *Thermus thermophilus*、*Pyrococcus furiosus*、*Aquifex aeolicus* 等由来の酵素は耐熱性があり、本発明に好適に利用し得る。

【0078】

融合タンパク質用の乳酸デヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.27) としては、下記の化学反応を触媒する機能が同定されており、遺伝子の塩基配列または酵素のアミノ酸配列が既知のものであれば利用できる。すなわち、その由来は特に限定されない。

50

反応式 6 :



そのような乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子としては、*Bacillus*属、例えば*Bacillus subtilis* 168[Nature 390:249-56 (1997)]、*Lactococcus*属、例えば*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403[Genome Res 11:731-53 (2001)]、*Lactobacillus*属、例えば*Lactobacillus plantarum* WCFS1[Proc Natl Acad Sci U S A 100:1990-5 (2003)]、*Lactobacillus johnsonii* NCC 533[Proc Natl Acad Sci U S A : (2004)]、*Deinococcus*属、例えば*Deinococcus radiodurans* R1[Science 286:1571-7 (1999)]、*Thermus*属、例えば*Thermus thermophilus* HB27[Nat Biotechnol 22:547-53 (2004)]、*Thermotoga*属、例えば*Thermotoga maritima* MSB8[Nature 399:323-9 (1999)]等を挙げることができ、いずれも本発明の融合タンパク質の構成要素として利用することができる。特に*Thermus thermophilus*、*Thermotoga maritima*等由来の酵素は耐熱性があり、本発明に好適に利用し得る。

【 0 0 7 9 】

融合タンパク質用のジアフォラーゼとしては、ジアフォラーゼ活性が確認されており、遺伝子DNAの塩基配列または酵素のアミノ酸配列が既知のものであれば利用できる。すなわち、その由来は特に限定されない。ジアフォラーゼ活性は、メチレンブルーや2,6-ジクロロフェノール-インドフェノールのような人工的電子受容体の存在下に、NADH若しくはNADPHを酸化する触媒反応である。このようなジアフォラーゼ活性を有する酵素としては、NADHまたはNADPHのいずれか、またはその両方に特異性を有するかに基づき次のように分類されている。

- (1) EC 1.6.99.1 ; NADPH:(acceptor) oxidoreductase.
- (2) EC 1.6.99.2 ; NAD(P)H:(quinone-acceptor) oxidoreductase.
- (3) EC 1.6.99.3 ; NADH:(acceptor) oxidoreductase.
- (4) EC 1.6.99.5 ; NADH:(quinone-acceptor) oxidoreductase.
- (5) EC 1.8.1.4 ; protein-N6-(dihydrolipoyl)lysine:NAD+ oxidoreductase.
- (6) EC 1.14.13.39 ; L-arginine,NADPH:oxygen oxidoreductase (nitric-oxide-forming)。

【 0 0 8 0 】

本発明の酵素電極においては、ジアフォラーゼと融合または共存させて用いられるデヒドロゲナーゼがNADPH若しくはNADHのいずれかに基質特異性を有するかにより、該デヒドロゲナーゼと同一の基質特異性を有するジアフォラーゼを選択して用いることが望ましい。

【 0 0 8 1 】

上記(1)のジアフォラーゼを用いる場合には、下記の化学反応を触媒する機能が同定されており、遺伝子の塩基配列または酵素のアミノ酸配列が既知のものであれば利用できる。すなわち、その由来は特に限定されない。

反応式 7 :



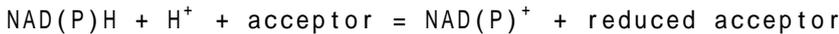
そのようなジアフォラーゼ遺伝子としては、*Saccharomyces*属、例えば*Saccharomyces cerevisiae* S288C[Science 274:546-67 (1996), Proc Natl Acad Sci U S A 92:3809-13 (1995), EMBO J 13:5795-809 (1994), Nature 357:38-46 (1992), Nature 387:75-8 (1997), Nature 387:78-81 (1997), Nat Genet 10:261-8 (1995), Nature 387:81-4 (1997), Science 265:2077-82 (1994), Nature 387:84-7 (1997), EMBO J 15:2031-49 (1996), Nature 369:371-8 (1994), Nature 387:87-90 (1997), Nature 387:90-3 (1997), Nature 387:93-8 (1997), Nature 387:98-102 (1997), Nature 387:103-5 (1997)], *Candida*属、例えば*Candida albicans* SC5314[Proc Natl Acad Sci U S A 101:7329-34 (2004)]等由来のものを挙げることができる。

【 0 0 8 2 】

上記(2)のジアフォラーゼを用いる場合には、下記の化学反応を触媒する機能が同定

されており、遺伝子の塩基配列または酵素のアミノ酸配列が既知のものであれば利用できる。すなわち、その由来は特に限定されない。

反応式 8 :

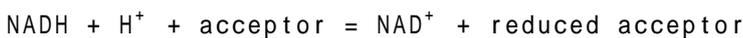


そのようなジアフォラーゼ遺伝子としては、Pseudomonas属、例えばPseudomonas aeruginosa PA01[Nature 406:959-64 (2000)], Pseudomonas putida KT2440[Environ Microbiol 4:799-808 (2002)], Bacillus属、例えばBacillus cereus ATCC 14579[Nature 423:87-91 (2003)],等由来のものを挙げる事ができる。

【 0 0 8 3 】

上記(3)のジアフォラーゼを用いる場合には、下記の化学反応を触媒する機能が同定されており、遺伝子の塩基配列または酵素のアミノ酸配列が既知のものであれば利用できる。すなわち、その由来は特に限定されない。

反応式 9 :

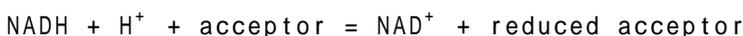


そのようなジアフォラーゼ遺伝子としては、Saccharomyces属、例えばSaccharomyces cerevisiae S288C[Science 274:546-67 (1996), Proc Natl Acad Sci U S A 92:3809-13 (1995), EMBO J 13:5795-809 (1994), Nature 357:38-46 (1992), Nature 387:75-8 (1997), Nature 387:78-81 (1997), Nat Genet 10:261-8 (1995), Nature 387:81-4 (1997), Science 265:2077-82 (1994), Nature 387:84-7 (1997), EMBO J 15:2031-49 (1996), Nature 369:371-8 (1994), Nature 387:87-90 (1997), Nature 387:90-3 (1997), Nature 387:93-8 (1997), Nature 387:98-102 (1997), Nature 387:103-5 (1997)] Pseudomonas属、例えばPseudomonas aeruginosa PA01[Nature 406:959-64 (2000)], Pseudomonas putida KT2440[Environ Microbiol 4:799-808 (2002)], Acinetobacter属、例えばAcinetobacter sp. AD P1[Nucleic Acids Res 32:5766-79 (2004)], Bacillus属、例えばBacillus subtilis 168[Nature 390:249-56 (1997)], Lactobacillus属、例えばLactobacillus plantarum WCFS1[Proc Natl Acad Sci U S A 100:1990-5 (2003)], Deinococcus属、例えばDeinococcus radiodurans R1[Science 286:1571-7 (1999)], Thermus属、例えばThermus thermophilus HB27[Nat Biotechnol 22:547-53 (2004)], Aquifex属、例えばAquifex aeolicus VF5[Nature 392:353-8 (1998)], Pyrococcus属、例えばPyrococcus abyssi GE5, Pyrococcus furiosus DSM 3638[Genetics 152:1299-305 (1999), Mol Microbiol 38:684-93 (2000), , Methods Enzymol 330:134-57 (2001)]等由来のものを挙げる事ができる。

【 0 0 8 4 】

上記(4)のジアフォラーゼを用いる場合には、下記の化学反応を触媒する機能が同定されており、遺伝子の塩基配列または酵素のアミノ酸配列が既知のものであれば利用できる。すなわち、その由来は特に限定されない。

反応式 10 :

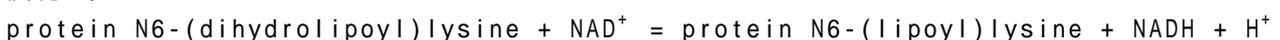


そのようなジアフォラーゼ遺伝子としては、Burkholderia属、例えばBurkholderia mallei ATCC 23344[Proc Natl Acad Sci U S A 101:14246-51 (2004)], Haloarcula属、例えばHaloarcula marismortui ATCC 43049[Genome Res 14:2221-34 (2004)]等由来のものを挙げる事ができる。

【 0 0 8 5 】

上記(5)のジアフォラーゼを用いる場合には、下記の化学反応を触媒する機能が同定されており、遺伝子の塩基配列または酵素のアミノ酸配列が既知のものであれば利用できる。すなわち、その由来は特に限定されない。

反応式 11 :



10

20

30

40

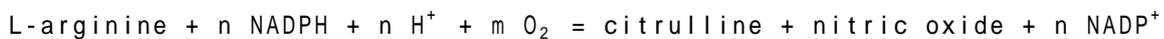
50

そのようなジアフォラーゼ遺伝子としては、*Saccharomyces*属、例えば*Saccharomyces cerevisiae* S288C[*Science* 274:546-67 (1996), *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3809-13 (1995), *EMBO J* 13:5795-809 (1994), *Nature* 357:38-46 (1992), *Nature* 387:75-8 (1997), *Nature* 387:78-81 (1997), *Nat Genet* 10:261-8 (1995), *Nature* 387:81-4 (1997), *Science* 265:2077-82 (1994), *Nature* 387:84-7 (1997), *EMBO J* 15:2031-49 (1996), *Nature* 369:371-8 (1994), *Nature* 387:87-90 (1997), *Nature* 387:90-3 (1997), *Nature* 387:93-8 (1997), *Nature* 387:98-102 (1997), *Nature* 387:103-5 (1997)], *Lactobacillus*属、例えば*Lactobacillus plantarum* WCFS1[*Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1990-5 (2003)], *Deinococcus*属、例えば*Deinococcus radiodurans* R1[*Science* 286:1571-7 (1999)], *Thermus*属、例えば*Thermus thermophilus* HB27[*Nat Biotechnol* 22:547-53 (2004)], *Aquifex*属、例えば*Aquifex aeolicus* VF5[*Nature* 392:353-8 (1998)], *Thermotoga*属、例えば*Thermotoga maritima* MSB8[*Nature* 399:323-9 (1999)], *Sulfolobus*属、例えば*Sulfolobus solfataricus*[*Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7835-40 (2001)], *Sulfolobus tokodaii* strain7[*DNA Res* 8:123-40 (2001)], *Pyrobaculum*属、例えば*Pyrobaculum aerophilum* IM2[*Proc Natl Acad Sci U S A* 99:984-9 (2002)]等由来のものを挙げる事ができる。

【 0 0 8 6 】

上記(6)のジアフォラーゼを用いる場合には、下記の化学反応を触媒する機能が同定されており、遺伝子の塩基配列または酵素のアミノ酸配列が既知のものであれば利用できる。すなわち、その由来は特に限定されない。

反応式 1 2 :



そのようなジアフォラーゼ遺伝子としては、*Bacillus*属、例えば*Bacillus cereus* ATCC 14579[*Nature* 423:87-91 (2003)]等由来のものを挙げる事ができる。

特に*Thermus thermophilus*、*Thermotoga maritima*、*Sulfolobus tokodaii*、*Pyrobaculum aerophilum*等由来の酵素は耐熱性があり、本発明に好適に利用し得る。

【 0 0 8 7 】

融合タンパク質用のリンゴ酸デヒドロゲナーゼとしては、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ活性が確認されており、遺伝子DNAの塩基配列または酵素のアミノ酸配列が既知のものであれば利用できる。すなわち、その由来は特に限定されない。リンゴ酸デヒドロゲナーゼは次のように分類されている：

- (A) EC 1.1.1.37 ; (S)-malate:NAD⁺ oxidoreductase
- (B) EC 1.1.1.38 ; (S)-malate:NAD⁺ oxidoreductase (oxaloacetate-decarboxylating)
- (C) EC 1.1.1.39 ; (S)-malate:NAD⁺ oxidoreductase (decarboxylating)
- (D) EC 1.1.1.40 ; (S)-malate:NADP⁺ oxidoreductase (oxaloacetate-decarboxylating)

これらの内、EC 1.1.1.37の酵素は化学反応の平衡がリンゴ酸生成側に偏っているので、EC 1.1.1.38、EC 1.1.1.39、EC 1.1.1.40に分類される酵素がより望ましい。そのようなリンゴ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子としては、*Bacillus*属、例えば*Bacillus cereus* ATCC 10987 [*Nucleic Acids Res* 32:977-88 (2004)]、*Bacillus subtilis* 168 [*Nature* 390:249-56 (1997)]、*Lactobacillus*属、例えば*Lactobacillus plantarum* WCFS1 [*Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1990-5 (2003)]、*Pseudomonas*属、例えば*Pseudomonas aeruginosa* PA01 [*Nature* 406:959-64 (2000)]、*Pseudomonas putida* KT2440 [*Environ Microbiol* 4:799-808 (2002)]、*Pyrococcus furiosus* DSM 3638 [*Genetics* 152:1299-305 (1999), *Mol Microbiol* 38:684-93 (2000), , *Methods Enzymol* 330:134-57 (2001)]、*Saccharomyces*属、例えば*Saccharomyces cerevisiae* S288C [*Science* 274:546-67 (1996), *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3809-13 (1995), *EMBO J* 13:5795-809 (1994), *Nature* 357:38-46 (1992), *Nature* 387:75-8 (1997), *Nature* 387:78-81 (1997), *Nat Genet* 10:261-8 (1995), *Natur*

e 387:81-4 (1997), Science 265:2077-82 (1994), Nature 387:84-7 (1997), EMBO J 15:2031-49 (1996), Nature 369:371-8 (1994), Nature 387:87-90 (1997), Nature 387:90-3 (1997), Nature 387:93-8 (1997), Nature 387:98-102 (1997), Nature 387:103-5 (1997)]、Sulfolobus属、例えばSulfolobus solfataricus [Proc Natl Acad Sci U S A 98:7835-40 (2001)]、Sulfolobus tokodaii strain7 [DNA Res 8:123-40 (2001)]、Thermotoga属、例えばThermotoga maritima MSB8 [Nature 399:323-9 (1999)]、Thermus属、例えばThermus thermophilus HB27 [Nat Biotechnol 22:547-53 (2004)]等由来のものを挙げることができる。

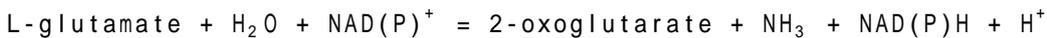
特にThermus thermophilus、Thermotoga maritima、Pyrococcus furiosus、Sulfolobus tokodaii等由来の酵素は耐熱性があり、本発明に好適に利用し得る。

10

【0088】

融合タンパク質用のグルタミン酸デヒドロゲナーゼ (EC 1.4.1.2, EC 1.4.1.3, EC 1.4.1.4) としては、下記式の化学反応を触媒する機能が同定されており、遺伝子DNAの塩基配列または酵素のアミノ酸配列が既知のものであれば利用できる。すなわち、その由来は特に限定されない。

反応式 13 :



そのようなグルタミン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子としては、Bacillus属、例えばBacillus clausii KSM-K16、Bacillus subtilis 168 [Nature 390:249-56 (1997)]、Burkholderia属、例えばBurkholderia mallei ATCC 23344 [Proc Natl Acad Sci U S A 101:14246-51 (2004)]、Deinococcus属、例えばDeinococcus radiodurans R1 [Science 286:1571-7 (1999)]、Geobacillus属、例えばGeobacillus kaustophilus HTA426 [Nucleic Acids Res 32:6292-303 (2004)]、Lactobacillus属、例えばLactobacillus plantarum WCFS1 [Proc Natl Acad Sci U S A 100:1990-5 (2003)]、Pyrococcus属、例えばPyrococcus horikoshii OT3 [DNA Res 5:55-76 (1998)]、Pseudomonas属、例えばPseudomonas aeruginosa PA01 [Nature 406:959-64 (2000)]、Pseudomonas putida KT2440 [Environ Microbiol 4:799-808 (2002)]、Pyrococcus属、例えばPyrococcus abyssi GE5、Pyrococcus furiosus DSM 3638 [Genetics 152:1299-305 (1999), Mol Microbiol 38:684-93 (2000), Methods Enzymol 330:134-57 (2001)]、Sulfolobus属、例えばSulfolobus solfataricus [Proc Natl Acad Sci U S A 98:7835-40 (2001)]、Sulfolobus tokodaii strain7 [DNA Res 8:123-40 (2001)]、Thermococcus属、例えばThermococcus kodakaraensis KOD1 [Genome Res 15:352-63 (2005)]、Thermotoga属、例えばThermotoga maritima MSB8 [Nature 399:323-9 (1999)]、Thermus属、例えばThermus thermophilus HB27 [Nat Biotechnol 22:547-53 (2004)]、Thermus thermophilus HB8等由来のものを挙げることができる。特にThermus thermophilus、Thermotoga maritima、Pyrococcus furiosus、Sulfolobus tokodaii等由来の酵素は耐熱性があり、本発明に好適に利用し得る。

20

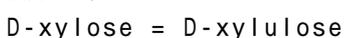
30

【0089】

融合タンパク質用のイソメラーゼ (キシロースイソメラーゼ) (EC 5.3.1.5) としては、下記式の化学反応を触媒する機能が同定されており、遺伝子DNAの塩基配列または酵素のアミノ酸配列が既知のものであれば利用できる。すなわち、その由来は特に限定されない。

40

反応式 14 :



そのようなイソメラーゼ遺伝子としては、Escherichia属、例えば、Escherichia coli K-12 MG1655 [Science 277:1453-74 (1997)]、Escherichia coli K-12 W3110、Bacillus属、例えば、Bacillus subtilis 168 [Nature 390:249-56 (1997)]、Lactococcus属、例えば、Lactococcus lactis subsp. lactis IL1403 [Genome Res 11:731-53 (2001)]、Thermotoga属、例えば、Thermotoga maritima MSB8 [Nature 399:323-9 (1999)] 等由来のもの

50

を挙げることができる。特に *Thermotoga maritima* 由来の酵素は耐熱性があり、本発明に好適に利用し得る。

【0090】

前述したように本発明で用いる融合タンパク質のアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列は、酵素1のアミノ酸配列をコードする塩基配列の上流または下流に酵素2のアミノ酸配列をコードする塩基配列を連結して得ることができる。この連結形態は、この連結された塩基配列に基づいて発現する融合タンパク質において酵素1及び2のそれぞれが活性を有するものであればよい。

【0091】

この融合タンパク質のアミノ酸配列において、酵素1のアミノ酸配列と酵素2のアミノ酸配列との間にはスペーサー配列を挿入することができる。スペーサー配列の構造及び長さは、以下の要件に基づいて選択されることが好ましい。

(1) 酵素1と酵素2の各々が夫々固有のフォールディングをとることを可能にし夫々の酵素活性の維持を保证する。

(2) 酵素1の触媒する酵素反応により生じる反応生成物1の内、酵素2の触媒する酵素反応の基質となる化学種ができるだけ速やかに酵素2にまで拡散により到達できる。

【0092】

そのようなスペーサー配列の長さとしては、およそ3~400アミノ酸が好ましく、スペーサーの配列としては、上記性質を有するものであれば特には限定されない。例えば、GGGGS (G:グリシン、S:セリン)、あるいはこの配列単位が2以上5以下程度繰り返されている配列を挙げることができる。また、Patrickの文献(J.Mol.Biol. (1990) 211,943-958)に記載される以下のものを用いることもできる。

タイプI (STGタイプ) ;

セリン(S)、トレオニン(T)および/またはグリシン(G)のみからなる配列。

タイプII :

セリン、トレオニンおよび/またはグリシンの他、一つの、アスパラギン酸(D)、リジン(K)、グルタミン(Q)、アスパラギン(N)、アラニン(A)あるいはプロリン(P)からなる配列。

タイプIII (STGDKQNAタイプ) :

STGタイプIとIIのアミノ酸残基からなる組み合わせ配列。

(タイプIII (STGDKQNAタイプ))、

STGタイプIとIIのアミノ酸残基からなる組み合わせ配列STGタイプIとIIのアミノ酸残基からなる組み合わせ配列タイプIとタイプIIであって、複数個のプロリンを有する配列。

タイプIV (Protoタイプ) :

タイプIとタイプIIであって、複数個のプロリンを有する配列。

タイプV :

タイプIIIに含まれるアミノ酸残基の任意の組み合わせであり、少なくとも8つのアミノ酸残基を有している配列。

【0093】

上記の他、GSGSG、SGGSG、NGGGG、EGKSSGSGSESKST、SKSTS、PVPSTPPPTPSPSTPPPTPSM等を更に挙げることができる。

【0094】

スペーサー配列は、酵素1のアミノ酸配列をコードする塩基配列と、酵素2のアミノ酸配列をコードする塩基配列との間に、挿入する。その際、酵素1のアミノ酸配列をコードする塩基配列と、酵素2のアミノ酸配列をコードする塩基配列の夫々の読み枠がずれないようにして挿入する。この挿入は、当該分野の公知の方法を用いて行うことができる。

【0095】

本発明で用いられる融合タンパク質において、酵素1あるいは酵素2の酵素活性の機能単位が単鎖のポリペプチド(モノマー)ではない場合であっても、以下に述べる何れかの

10

20

30

40

50

構成を採用することによって本発明の目的を達成することができる。

【0096】

(1) 何れか一方の酵素の機能単位がホモオリゴマーである場合。

例えば酵素1の機能的なポリペプチド構成が n [$n > 1$ の整数]と表され、酵素2の機能的なポリペプチド構成が m と表されるとする。目的のポリペプチド構成の融合タンパク質 ($n::m$)を得るためには、融合ポリペプチド ($n::m$)に加えて、ホモオリゴマーを機能単位とする酵素の構成ポリペプチド (n)を宿主細胞内で共発現させる。共発現されるべき2つのポリペプチド ($n::m$ と n)は、同一のプラスミド上にコードされていても、また相異なるプラスミド上にコードされていてもよい。ただし相異なるプラスミドを用いる場合には、両者のプラスミドは不和合性を持たないことが必要である。この系では目的とする融合タンパク質 ($n::m$)に加えて、 n や $n-x$ ($n-x$)_x [x は $n+1 > x > 0$ なる整数]などといったペプチド構成の目的外タンパク質が生成し得る。これらは例えば夫々の分子量の違いにより、ゲルろ過法や限外ろ過法を用いて分画・精製できる。なお $n-x$ ($n-x$)_x [x は $n+1 > x > 0$ なる整数]なる構成の融合タンパク質でも、酵素1および酵素2双方の酵素活性が保持されていれば、本発明の酵素電極に供し得る。

10

【0097】

(2) 何れか一方の酵素の機能単位がヘテロオリゴマーである場合。

例えば酵素1の機能的なポリペプチド構成が n ' [ただし 'は n 以外のポリペプチド鎖をまとめて表現するものとし、 n は $n > 0$ の整数とする]と表わされ、酵素2の機能的なポリペプチド構成が m と表わされるものとする。目的のポリペプチド構成の融合タンパク質 ($n'::m$)を得るためには、融合ポリペプチド ($n'::m$)に加えて、ヘテロオリゴマーを機能単位とする酵素の構成ポリペプチド (n' 及び m)を宿主細胞内で共発現させる。共発現されるべきポリペプチド鎖 ($n'::m$ 、 n' および m)は、同一のプラスミド上にコードされていても、また相異なるプラスミド上にコードされていてもよい。ただし相異なるプラスミドを用いる場合には、両者のプラスミドは不和合性を持たないことが必要である。この系では目的とする融合タンパク質 ($n'::m$)に加えて、 $n-x$ ' ($n-x$ ')_x [x は $n+1 > x > 0$ なる整数]や n' ' といったペプチド構成のタンパク質が生成し得る。これらは例えば夫々の分子量の違いにより、ゲルろ過法や限外ろ過法を用いて分画・精製できる。なお $n-x$ ' ($n-x$ ')_x [x は $n+1 > x > 0$ なる整数]なる構成の融合タンパク質でも、酵素1および酵素2双方の酵素活性が保持されていれば、本発明の酵素電極に供し得る。このような融合タンパク質の生成を抑えるためには、ヘテロオリゴマーの構成ユニットの内、機能的な構成の中で最も数の少ないもの、すなわち $n=1$ となるものを n' として選択することが望ましい。 $n=1$ の n' を選択できる場合には共発現されるべきポリペプチド鎖は $n'::m$ および m のみでよい。

20

30

【0098】

(3) 双方の酵素の機能単位がホモオリゴマーである場合。

例えば酵素1の機能的なポリペプチド構成が n [$n > 1$ の整数]と表され、酵素2の機能的なポリペプチド構成が m [$m > 1$ の整数]と表されるものとする。目的のポリペプチド構成の融合タンパク質 ($n::m$)を得るためには、融合ポリペプチド ($n::m$)に加えて、ホモオリゴマーを機能単位とする酵素の構成ポリペプチド (n および m)を宿主細胞内で共発現させる。共発現されるべき3つのポリペプチド ($n::m$ 、 n および m)は、同一のプラスミド上にコードされていても、また相異なるプラスミド上にコードされていてもよい。ただし相異なるプラスミドを用いる場合には、両者のプラスミドは不和合性を持たないことが必要である。この系では目的とする融合タンパク質 ($n::m$)に加えて、 n 、 m や $n-x$ ($n-x$)_x、 $m-x$ ($m-x$)_x [$\min(n,m) > x > 1$]などといったペプチド構成の目的外タンパク質が生成し得る。これらは例えば夫々の分子量の違いにより、ゲルろ過法や限外ろ過法を用いて分画・精製できる。なお $n-x$ ($n-x$)_x、 $m-x$ ($m-x$)_x [$\min(n,m) > x > 0$]なる構成の融合タンパク質でも、酵素1および酵素2双方の酵素活性が保持されていれば、本発明の酵素電極に供し得る。

40

【0099】

50

(4) 一方の酵素の機能単位がホモオリゴマーであり、他方の酵素の機能単位がヘテロオリゴマーである場合。

例えば酵素1の機能的なポリペプチド構成が n [$n > 1$ の整数]と表され、酵素2の機能的なポリペプチド構成が m ' [ただし 'は 以外のポリペプチド鎖をまとめて表現するものとし、 $m > 0$ の整数とする]と表されるものとする。目的のポリペプチド構成の融合タンパク質 ($n :: m$ ')を得るためには、融合ポリペプチド ($::$)に加えて、ホモオリゴマーを機能単位とする酵素の構成ポリペプチド ($、 および '$)を宿主細胞内で共発現させる。共発現されるべきポリペプチド ($:: 、 、 および '$)は、同一のプラスミド上にコードされていても、また相異なるプラスミド上にコードされていてもよい。ただし相異なるプラスミドを用いる場合には、両者のプラスミドは不和合性を持たないことが必要である。この系では目的とする融合タンパク質 ($n :: m$ ')に加えて、 n 、 m 'や $n-x$ ($::$) $_x$ $m-x$ ' [$\min(n,m) > x > 0$]などといったペプチド構成の目的外タンパク質が生成し得る。これらは例えば夫々の分子量の違いにより、ゲルろ過法や限外ろ過法を用いて分画・精製できる。なお $n-x$ ($::$) $_x$ $m-x$ ' [$\min(n,m) > x > 0$]なる構成の融合タンパク質でも、酵素1および酵素2双方の酵素活性が保持されていれば、本発明の酵素電極に供し得る。しかし、このような融合タンパク質の生成を抑えるためには、ヘテロオリゴマーの構成ユニットの内、機能的な構成の中で最も数の少ないもの、すなわち $m=1$ となるものを として選択することが望ましい。 $m=1$ の を選択できる場合には共発現されるべきポリペプチド鎖は $:: 、 および '$ のみでよい。

【0100】

(5) 双方の酵素の機能単位がヘテロオリゴマーである場合。

例えば酵素1の機能的なポリペプチド構成が n ' [ただし 'は 以外のポリペプチド鎖をまとめて表現するものとし、 $n > 0$ の整数とする]と表されるものとする。酵素2の機能的なポリペプチド構成が m ' [ただし 'は 以外のポリペプチド鎖をまとめて表現するものとし、 $m > 0$ の整数とする]と表されるものとする。目的のポリペプチド構成の融合タンパク質 ($n ' :: m '$)を得るためには、融合ポリペプチド ($::$)に加えて、ヘテロオリゴマーを機能単位とする酵素の構成ポリペプチド ($、 '、 および '$)を宿主細胞内で共発現させる。共発現されるべきポリペプチド ($:: 、 '、 および '$)は、同一のプラスミド上にコードされていても、また相異なるプラスミド上にコードされていてもよい。ただし相異なるプラスミドを用いる場合には、両者のプラスミドは不和合性を持たないことが必要である。この系では目的とする融合タンパク質 ($n ' :: m '$)に加えて、 n '、 m '、 $n-x$ ' ($::$) $_x$ $m-x$ ' [$\min(n,m) > x > 1$]などといったペプチド構成の目的外タンパク質が生成し得る。これらは例えば夫々の分子量の違いにより、ゲルろ過法や限外ろ過法を用いて分画・精製できる。なお $n-x$ ' ($::$) $_x$ $m-x$ ' [$\min(n,m) > x > 0$]なる構成の融合タンパク質でも、酵素1および酵素2双方の酵素活性が保持されていれば、本発明の酵素電極に供し得る。しかし、このような融合タンパク質の生成を抑えるためには、ヘテロオリゴマーの構成ユニットの内、機能的な構成の中で最も数の少ないもの、すなわち $n=1$ となるものを として、また $m=1$ となるものを として選択することが望ましい。 $n=1$ の および $m=1$ の を選択できる場合には共発現されるべきポリペプチド鎖は $:: 、 'および '$ のみでよい。

【0101】

なお上記(1)から(5)の全ての場合において、酵素1と酵素2の単語を入れ替えた表現の構成も可能である。

【0102】

また上記(1)から(5)の全ての場合において、細胞内共発現系ではなく、*in vitro*無細胞タンパク質合成系を採用することもできる。この場合、*in vitro*タンパク質合成装置にて夫々の構成ポリペプチドを合成後、これらを混合することによって目的のポリペプチド構成を持つ融合タンパク質を形成させることができる。

【0103】

本発明の酵素電極に用いられる融合タンパク質のアミノ酸配列をコードするDNAを、

10

20

30

40

50

適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、様々な宿主内で発現可能な融合タンパク質発現ベクターを構築することができる。当業者ならば、当該技術分野での常法に従い、任意の宿主細胞内で機能的な融合タンパク質発現ベクターを構築することができる。プロモーターは既知のものから適宜選択するか、あるいは新たに調製したものでよい。また通常の技術を用いて修飾（例えば、プロモーターを交換する）することによって、融合タンパク質を高レベルに産生させることができる発現ベクターを構築することができる。

【0104】

融合タンパク質発現ベクターで形質転換するために用いられる宿主細胞は、大腸菌等の原核細胞、酵母等の真核細胞のいずれでもよく、さらには一般的に利用されている高等生物の細胞でもよい。宿主細胞としては、微生物〔原核生物（細菌、例えば大腸菌や枯草菌等）、真核生物（例えば酵母）〕、動物細胞又は培養植物細胞が挙げられる。微生物としては、原核生物や酵母が好ましい。原核生物としては、特にEscherichia属に属する菌株（例えば、E.coli等）が好ましい。酵母としては、特にSaccharomyces属に属する株（例えば、S.cerevisiae）やCandida属に属する株（例えば、C.boidinii）が好ましい。動物細胞株としては例えば、マウスL929細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞などを挙げる事ができる。

10

【0105】

宿主細胞として細菌、特に大腸菌を使用するのに適した、発現ベクターは既知である。例えば、lacプロモーターやtacプロモーター等の慣用のプロモーターを有するものを挙げる事ができる。酵母での融合タンパク質の発現のための発現ベクターとしては、GALプロモーターやAODプロモーター等のプロモーターを含有するものが好ましい。又、哺乳動物細胞での融合タンパク質発現のための発現ベクターとしては、SV40プロモーター等のプロモーターを有するものが挙げられる。しかしながら、操作及び入手の容易さを考慮して、宿主細胞としては原核性宿主が好ましく、特に大腸菌が好ましい。原核性宿主-ベクター系については、多くの成書があり、当該技術分野で既知であるが、以下に簡単に説明する。（例えばMolecular Cloning: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照。）

20

融合タンパク質をコードするDNAを大腸菌で発現させるには、大腸菌を用いた形質転換に適するプラスミドのプロモーターの下流に該DNAを挿入する。

30

後述する実施例では、大腸菌での1つの態様の発現が記載されているが、他の態様での発現は、例えば、融合タンパク質をコードするDNAを適当な酵素（例えば制限酵素、アルカリホスファターゼ、ポリヌクレオチドキナーゼ、DNAリガーゼ、DNAポリメラーゼなど）で処理することにより融合タンパク質コードするDNA断片を得、これを適当なベクターに組み込むことにより様々な宿主で融合タンパク質活性を有するペプチドを発現させることができる。

【0106】

タンパク質発現のためのベクターによる宿主細胞の形質転換方法は既知であり、この既知の方法を利用して本発明で用いる融合タンパク質の発現を行うことができる。例えば、原核性宿主の場合は、コンピテントセル作製法、真核性宿主の場合は、コンピテントセル作製法、哺乳動物細胞の場合はトランスフェクション法、エレクトロポレーション法により行うことができる。次いで、得られた形質転換体を適当な培地に培養する。培地は、炭素源（例えばグルコース、メタノール、ガラクトース、フルクトース等）及び無機または有機窒素源（例えば、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸ナトリウム、ペプトン、カザミノ酸等）を含有してよい。所望により、培地に他の栄養源（例えば無機塩類（塩化ナトリウム、塩化カリウム）、ビタミン類（例えばビタミンB1）、抗生物質（例えばアンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシン等））を加えてもよい。哺乳動物細胞の培養には、イーグル培地が適当である。

40

【0107】

形質転換体の培養は、通常、pH 6.0 ~ 8.0、好ましくはpH 7.0、25 ~ 40、

50

好ましくは30～37 で8～48時間行えばよい。生産された融合タンパク質が培養液中に存在しているときは、培養物を濾過又は遠心分離する。精製は、回収した培養液上清から、天然又は合成のタンパク質の精製、単離に用いられる常法を用いて行うことができる。例えば透析、ゲル濾過、対応する抗融合タンパク質モノクローナル抗体を用いてのアフィニティカラムクロマトグラフィー、適当な吸着剤を用いてのカラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー等を用いることができる。生産された融合タンパク質が培養形質転換体のペリプラズム及び細胞質中に存在するときは、濾過や遠心分離によって細胞を集め、それらの細胞壁及び/又は細胞膜を、たとえば超音波及び/又はリゾチーム処理によって破壊して細胞破砕物を得る。この細胞破砕物に適当な水溶液(例えば緩衝液)を混合し、常法によって、融合タンパク質を精製することができる。大腸菌中で生産された融合タンパク質を再生(リフォールディング)する必要があるときは、これを常法によって行うことができる。特に好熱菌由来の融合酵素を調製する場合には、上記細胞破砕液を70以上の温度で恒温保持することにより宿主常温菌由来のタンパク質を凝集させ、該凝集体を遠心分離操作などで除去することにより、簡便に精製することが出来る。また活性を有するフォールドへ変換することが出来る。

10

【0108】

尚、用途に応じて融合タンパク質は完全に精製されていなくとも良く、次の(1)～(7)のいずれかであっても良い。

(1) 生細胞：ろ過又は遠心分離等の通常の方法で培養物から分離された細胞。

(2) 乾燥細胞：(1)に記載の生細胞を凍結乾燥又は真空乾燥したもの。

20

(3) 細胞抽出物：(1)又は(2)に記載の細胞を通常の方法(例えば有機溶媒中での自己溶菌、アルミナや海砂と混合しての摩砕、又は超音波処理)で処理して得られたもの。

(4) 酵素溶液：(3)に記載の細胞抽出物を常法通り精製するか部分精製することにより得られたもの。

(5) 精製酵素：(4)に記載の酵素溶液をさらに精製し、不純物を含まないもの。

(6) 酵素活性を有するフラグメント：(5)に記載の精製酵素等を適当な方法で断片化処理することにより得られたペプチドフラグメント。

【0109】

本発明の酵素電極に用いられる融合タンパク質は、例えば組換え大腸菌の細胞内で生合成させた場合には、フラビン化合物、金属原子(Fe、Cu、Moなど)、ヘム等などの補欠分子族が結合したホロ酵素として取得できることが多い。特に生合成時にこれらの補欠分子族を予め培地中に添加しておくことにより、ホロ酵素の回収率を増加させることができる。しかし無細胞タンパク質合成装置などを用いてin vitroで融合ペプチドを取得した場合などでは、補欠分子族の結合していないアポ酵素として取得される。この場合には取得されたアポ酵素を、これら補欠分子族を添加したバッファー中で保持する工程を加えることによって、ホロ酵素を再構成することができる。

30

【0110】

本発明の酵素電極に用いられる融合タンパク質の遺伝子塩基配列を基に遺伝子工学的に常用される方法を用いることにより、融合タンパク質のアミノ酸配列中に適宜変異を導入した相当するタンパク質を製造することができる。この変異は、1個ないし複数個以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入、転移あるいは付加によるものを挙げるることができる。こうした変異・変換・修飾法は、以下の文献に記載されている。

40

日本生化学会編、「続生化学実験講座1、遺伝子研究法II」、p105(広瀬進)、東京化学同人(1986);日本生化学会編、「新生化学実験講座2、核酸III(組換えDNA技術)」、p233(広瀬進)、東京化学同人(1992);R. Wu, L. Grossman, ed., "Methods in Enzymology", Vol. 154, p. 350 & p. 367, Academic Press, New York (1987); R. Wu, L. Grossman, ed., "Methods in Enzymology", Vol. 100, p. 457 & p. 468, Academic Press, New York (1983); J. A. Wells et al., Gene, 34: 315, 1985; T. Grundstroem et al., Nucleic Acids Res., 13: 3305, 1985; J. Taylor et al., Nucleic Acids Res., 13: 8765, 1985; R. Wu ed., "Methods in Enzymology", Vol. 155, p.

50

568, Academic Press, New York (1987) ; A. R. Oliphant et al., Gene, 44: 177, 1986

例えば合成オリゴヌクレオチドなどを利用する位置指定変異導入法（部位特異的変異導入法）、Kunkel法、dNTP[S]法（Eckstein）、亜硫酸や亜硝酸などを用いる領域指定変異導入法等の方法が挙げられる。

【0111】

さらに得られた融合タンパク質は、化学的な手法でその含有されるアミノ酸残基を修飾することもできる。更には、ペプチダーゼ、例えばペプシン、キモトリプシン、パパイン、プロメライン、エンドペプチダーゼ、エキソペプチダーゼなどの酵素を用いて融合タンパク質を修飾したり、部分分解したりしてその誘導体などにすることができる。

10

【0112】

また精製用タグや移行シグナル配列を融合した融合タンパク質として発現させてもよい。こうした精製用タグや移行シグナル配列を融合した融合タンパク質の産生は遺伝子工学的に常用される融合産生法を用いることができる。精製用タグを融合した融合タンパク質はその精製用タグ部を利用してアフィニティクロマトグラフィーなどで精製することや、前述した酵素固定化層を形成するための固定化タグとしての利用が可能である。

【0113】

すなわち本発明の酵素電極における融合タンパク質は、1個以上のアミノ酸残基が同一性の点で酵素1および酵素2の天然のアミノ酸残基と異なるもの、1個以上のアミノ酸残基の位置が天然のものとは異なるものであってもよい。融合タンパク質は、酵素1および酵素2の天然のタンパク質に特有なアミノ酸残基が1個以上（例えば、1～80個、好ましくは1～60個、さらに好ましくは1～40個、さらに好ましくは1～20個、特には1～10個など）欠けている欠失類縁体でもよい。また、融合タンパク質は、酵素1および酵素2の天然のタンパク質に特有のアミノ酸残基の1個以上が他の残基で置換されている置換類縁体であってもよい。この場合の置換のアミノ酸残基個数は、例えば1～80個、好ましくは1～60個、さらに好ましくは1～40個、さらに好ましくは1～20個、特には1～10個とすることができる。

20

【0114】

融合タンパク質は、酵素1および酵素2の天然のタンパク質に特有のアミノ酸残基の1個以上のアミノ酸残基が付加されている付加類縁体であってもよい。この場合の付加されるアミノ酸残基個数は、例えば、1～80個、好ましくは1～60個、さらに好ましくは1～40個、さらに好ましくは1～20個、特には1～10個とすることができる。これらの変異は、酵素1および酵素2の天然のタンパク質の特徴であるドメイン構造がそれぞれ維持されたものを含むことができる。また、これらの変異は、融合タンパク質は酵素1および酵素2の天然のタンパク質にそれぞれ実質的に同等の一次構造コンフォメーションあるいはその一部を有しているものも含むことができる。さらにこれらの変異は、酵素1および酵素2の天然のタンパク質と実質的に同等の生物学的活性を有しているものも含むことができる。したがって上記のごとき変異体は、全て本発明の酵素電極における融合タンパク質として使用できる。

30

【0115】

変異型の融合タンパク質として、配列表の配列番号11、23、35、44、57、69、79、88、97、106、114、121、128若しくは135で示されるアミノ酸配列と高い相同性を有し、酵素1及び2の活性が維持されているものが挙げられる。この相同性としては、70%より高い相同性を有しているものが挙げられる、より好ましくは80%以上、特に好ましくは90%以上の相同アミノ酸配列を有するものが挙げられる。

40

【0116】

また、酵素1及び2の天然のタンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むDNAに対して相補的な塩基配列からなるDNAと、ストリンジентな条件下でハイブリダイズする変異DNAから翻訳される変異融合タンパク質も本発明で使用可能である。このストリンジентな条件下の変異の基準となる塩基配列としては、配列番号10、22、

50

34、43、56、68、78、87、96、105、113、120、127及び134の塩基配列を挙げることができる。また、このストリンジェントな条件下でハイブリダイズする範囲内の変異は酵素1及び2の活性を損なわないものである。

【0117】

さらに、以下の酵素1及び2と実質的に同等の酵素活性を有する変異型融合タンパク質も、本発明の酵素電極における融合タンパク質として使用できる。

酵素1：

配列番号10、22、127および134：グルコースデヒドロゲナーゼ。

配列番号34、43、113および120：アルコールデヒドロゲナーゼ。

配列番号56および68：乳酸デヒドロゲナーゼ。

配列番号78および87：リンゴ酸デヒドロゲナーゼ。

配列番号96および105：グルタミン酸デヒドロゲナーゼ。

酵素2：

配列番号10、22、34、43、56、68、78、87、96および105：ジアフォラーゼ。

配列番号113および120：アルデヒドデヒドロゲナーゼ。

配列番号127および134：イソメラーゼ。

【0118】

ここで、上記の「ストリンジェントな条件下にハイブリダイズ」するDNAとは、以下に示すDNAをいう。すなわち、

(1) 高イオン濃度下に、65の温度条件でハイブリダイズさせることにより、上記の基準となる塩基配列に対する相補配列からなるDNAと、変異を含む塩基配列からなるDNAが、DNA-DNAハイブリッドを形成する。

(2) 低イオン濃度下に、65の温度条件で30分間洗浄したあとでも上記(1)で得られたハイブリッドが維持される。

【0119】

なお、上記(1)の高イオン濃度条件は、6×SSC(900mMの塩化ナトリウム、90mMのクエン酸ナトリウム)により得ることができる。また、上記(2)の低イオン濃度条件は、0.1×SSC(15mMの塩化ナトリウム、1.5mMのクエン酸ナトリウム)により得ることあできる。

【0120】

具体的には、配列番号10、22、34、43、56、68、78、87、96、105、113、120、127若しくは134の塩基配列に対して、アミノ酸残基の1または数個が欠失、置換、若しくは付加された塩基配列からなるDNAが挙げられる。この変異も、酵素1及び2の活性を損なわない範囲で行われる。

【0121】

酵素1および酵素2の天然のタンパク質と「実質的に同等」とはタンパク質の活性、例えば、触媒活性、生理的な活性、生物学的な活性が実質的に同じであることを意味する。

【0122】

アミノ酸の置換、欠失、あるいは挿入は、しばしばポリペプチドの生理的な特性や化学的な特性に大きな変化を生ぜしめない。こうした場合、その置換、欠失、あるいは挿入を施されたポリペプチドは、そうした置換、欠失、あるいは挿入のされていないものと実質的に同一であるとされる。アミノ酸配列中のアミノ酸の実質的に同一な置換体としては、そのアミノ酸が属するところのクラスのうちの他のアミノ酸類から選ぶことができる。例えば、非極性(疎水性)アミノ酸としては、アラニン、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、トリプトファン、メチオニンなどが挙げられる。極性(中性)としては、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミンなどが挙げられる。陽電荷をもつアミノ酸(塩基性アミノ酸)としては、アルギニン、リジン、ヒスチジンなどが挙げられ、陰電荷をもつアミノ酸(酸性アミノ酸)としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などが挙げられる。

10

20

30

40

50

【0123】

本発明の酵素電極における電子伝達メディエーターは、酵素と導電性基体間の電子授受反応を促進し、測定感度・電流密度を高めるために電極系に含有される物質である。この電子伝達メディエーターとしては、上記のような物質である限り特に限定されない。例えば、中心金属とその配位子からなる金属錯体またはそのイオン化物、メタロセン類、フェナジンメトサルフェート、1-メトキシ-フェナジンメトサルフェート、キノン類、フェナジン、フェノチアジン、ピオローゲン、ベンジルピオローゲン、2,6-ジクロロフェノールインドフェノール(DCIP)、メチレンブルー、メルドーラブルー、トルイジンブルー、ガロシアニン、チオニン、ジメチルジスルホン化チオニン、ニューメチレンブルー、ブリリアントクレジルブルー、レソルフィン、アリザリンブリリアントブルー、サフラニン、およびこれらの誘導体などを挙げることができる。

【0124】

金属錯体化合物としては、中心金属として、Os、Fe、Ru、Co、Cu、Ni、V、Mo、Cr、Mn、Pt、Rh、Pd、Mg、Ca、Sr、Ba、Ti、Ir、Zn、Cd、Hg、Wの内から選ばれる少なくとも1種類を含むものが挙げられる。中心金属への配位子としては、ピロール、ピラゾール、イミダゾール、1,2,3-または1,2,4-トリアゾール、テトラゾール、2,2'-ビイミダゾール、ピリジン、2,2'-ピチオフェン、2,2'-ビピリジン、2,2':6',2''-ターピリジン、エチレンジアミン、ポルフィリン、フタロシアニン、アセチルアセトン、キノリノール、アンモニア、シアンイオン、トリフェニルホスフィンオキサイド、シクロペンタジエニル環およびそれらの誘導体を挙げることができる。

【0125】

金属錯体及びそのイオン化物としては、具体的には、オスミウム、ルテニウム、コバルト、ニッケル等の金属とビピリジンとから形成されるビピリジン錯体、フェリシアンイオン、オクタシアノタングステン酸イオン、オクタシアノモリブデン酸イオン等の金属錯体イオンを挙げることができる。

【0126】

メタロセン類としては、例えばフェロセン、1,1'-ジメチルフェロセン、フェロセンカルボン酸、フェロセンカルボキシアルデヒド等のフェロセン誘導体を挙げることができる。

【0127】

これらの電子メディエーターは本発明の効果を損なわない範囲内でその2種以上を組み合わせ用いることもできる。

【0128】

電子メディエーターは、本発明の酵素電極に全構成成分の0.5~10重量%、好適には1~5重量%含有される。ここで全構成成分とは導電性基体上の酵素固定化層に含まれる成分である。

【0129】

本発明の酵素電極に、電子の授受を行なう配線を接続することで各種用途に利用できる酵素電極デバイス(バイオセンサ、燃料電池、および電気化学反応装置)を作製することができる。このデバイスは、上記の板状(あるいは膜状またはの層状)の酵素電極を単層で、あるいは、その複数を用いて構成することができる。その複数を用いる場合は、互いの表面と裏面が対向するように積層配置することができる。なお、複数の場合は、各酵素電極の特性を均一としても、異なる特性の酵素電極の組み合わせが含まれるようにしてもよい。例えば、後述する燃料電池における場合のように、アノードとカソードとが交互に配置されるようにすることができる。このデバイスは、電極を単層から多層へと段数を変更することで、要求される電圧、出力に対応することができる。酵素電極の触媒としての酵素は、一般に電気化学の分野で用いられている貴金属触媒(例えば白金)と比較して、高い基質選択性を有する。そのため、一方の電極と、他方の電極における反応物質を隔離する機構を必要とせず、その結果、デバイスを簡素化することが可能となる。

【0130】

本発明の好ましいひとつの形態であるセンサは、本発明にかかる酵素電極を物質を検知するための検知部位として用いる構成を有する。代表的な構成としては、酵素電極を作用電極として、参照電極及び対極とセットで使用し、酵素電極で（電極に固定した酵素の機能により）検知可能な電流を検知する構成を挙げることができる。この電流の有無や量を検知して、これらの電極が接している液体中の物質の有無や量を検出することができる。具体的には図8に示す構成のセンサを挙げることができる。図8のセンサは、作用電極4、白金線対極5、銀塩化銀参照電極6を有して構成され、それぞれの電極にはリード線7、8、9が配線され、ポテンシオスタット10と接続されている。このセンサを、蓋2で密閉可能なウォータージャケットセル1内の試料溶液3の貯溜領域に配置する。作用電極に電位を印加して定常電流を測定することで、電解質中での基質の検出を行うことができる。なお、不活性ガス雰囲気での測定が必要な場合は、ガスクューブ12の外部末端のガス吹き込み口11から窒素などの不活性ガスを導入する。また、温度は、温調水流入口13及び温調水排出口14を利用した温度調節用の液体の供給により行うことができる。

10

【0131】

本発明の好ましいひとつの形態である燃料電池は、酵素電極をアノードまたはカソードの少なくとも一方として用いることを特徴とする。この場合にも、酵素電極は、板状や層状として単層で、あるいは2以上の層の積層構造として用いることができる。更に、積層構造とした場合に、積層方向にアノードとカソードを所定の配列に配置してもよい。代表的な構成としては、燃料となる物質を含む電解液を貯溜し得る反応槽と、反応槽中に所定の間隔で配置されたアノードとカソードとを有し、このアノード及びカソードの少なくとも一方に本発明にかかる酵素電極を用いた構成を挙げることができる。なお、この燃料電池は電解液を補充あるいは循環させるタイプや、電解液の補充や循環しないタイプとすることができる。この燃料電池は、酵素電極が使用できるものであれば、燃料の種類、構造、機能などは制限されない。この際、酵素電極の触媒として用いられている酵素は、高い基質選択性を有するため、一方の電極と、他方の電極における反応物質を隔離する機構を必要とせず、その結果、デバイスを簡素化することが可能となる。この燃料電池は、電極反応の触媒として用いる酵素に特有の高い触媒作用によって、物質を低い過電圧で酸化還元できることにより、高い駆動電圧を得ることが可能であり、高い安定性、電流密度によって、長寿命、高出力化が可能となる。

20

30

【0132】

燃料電池の一例を図9に示す。この燃料電池のセルの構成は先に図8に示したセンサでの基質測定用装置とほぼ同一であり、同一部材には同じ番号を付している。図8で示したセンサの代わりに、アノード15とカソード16を多孔質ポリプロピレンフィルム17を介して積層した構成の電極ユニットを用い、チューブ12を介して酸素ガスをセル内に導入して、燃料電池として作用させる。

【0133】

本発明の好ましいひとつの形態である電気化学反応装置では、電極反応の触媒として用いる酵素に特有の基質の高い選択性、触媒能を得ることができる。これに加えて、電気化学反応の特徴である、反応の定量性を更に得ることが可能である。その結果、高選択的、高効率で定量的に制御可能であり、担体と複数のメディエーターを用いた酵素電極による、高い安定性、電流密度によって、長寿命、高出力化が可能となる。この場合にも、酵素電極は、板状や層状として単層で、あるいは2以上の層の積層構造として用いることができる。代表的な構成として、一对の電極と必要に応じて設けられた参照電極とを反応液を貯溜し得る反応層内に配置して、一对に電極間に電流を流して、反応液中の物質に電気化学的反応を起させて目的とする反応生成物、分解物などを得る構成を挙げることができる。この場合、一对の電極の少なくとも一方に本発明にかかる酵素電極を用いることができる。反応液の種類や反応の条件などにかかる装置構成は、酵素電極が利用できるものであれば特に限定されない。例えば、酸化還元反応による反応生成物の取得や、目的とする分解物の取得などに利用できる。

40

50

なお、複数種類の酵素から成る反応系に、2つの関連する反応のそれぞれを触媒する以下の酵素1と酵素2を融合した融合タンパク質を用いることが反応効率や反応速度を向上させるために有効である例が知られている。

酵素1：反応基質1から反応生成物1を生じる化学反応を触媒する。

酵素2：反応基質2から反応生成物2を生じる化学反応を触媒する。

【0134】

Seoら (Applied and Environmental Microbiology 66(6) 2000, 2484-2490) は、酵素の融合によるUDP-glucoseとglucose-6-phosphateからtrehalose-6-phosphateを経たtrehaloseへの合成反応に対する影響について開示している。ここでは、Trehalose-6-phosphate synthetaseとTrehalose-6-phosphate phosphataseの融合タンパク質を用いている。非特許文献1によれば、この融合タンパク質を用いた場合に、それぞれの酵素を遊離の状態

10

【0135】

しかしながら、上記文献にて知られていた融合タンパク質については、電極との電子授受は確認されておらず、酵素電極として用いることはできなかった。

そこで、本発明者らは、既述の通り、新規な融合タンパク質の作製を試み、本発明を成すに至っている。

以下に実施例を挙げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明の方法は、これらの実施例のみに限定されるものではない。

20

【実施例】

【0136】

(実施例1：Bacillus subtilis由来のグルコースデヒドロゲナーゼ (busGDH) とPseudomonas putida由来のジアフォラーゼ (ppuDp) との融合タンパク質 (His-busGDH::ppuDp) [配列番号10、11]の調製)

Bacillus subtilis [ATCC 27370]から常法に従いゲノムDNAを調製する。このゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、805bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatGGATCCGtatccggatttaaaggaaaagtcgctcgtc-3' (BamHI) [配列番号1]

30

5'-aataatAAGCTTaccgcgccctgcctggaatgaaggatattg-3' (HindIII) [配列番号2]

このDNA増幅産物を制限酵素BamHIおよびHind IIIで切断し、pETDuet-1(Novagen社製)の同じ制限酵素サイトに挿入し、His-busGDH発現ベクターpETDuet-busGDHを作製する。

【0137】

次にPseudomonas putida KT2440 [ATCC 47054]から常法に従いゲノムDNAを調製する。このゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、729bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCATATGcttgtgaatgtactgatcgtccacgctcac-3' (NdeI) [配列番号3]

5'-aataatCTCGAGtcacgtcagcgggtacaacgcttcatcgaa-3' (XhoI) [配列番号4]

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pETDuet-busGDHの同じ制限酵素サイトに挿入し、His-busGDH、ppuDp共発現ベクターpETDuet-busGDH-ppuDpを作製する。

40

【0138】

次に、以下の5'末端リン酸化合成オリゴDNAをTEバッファー中で、等量混合し、加熱後徐冷することによってアニーリングする。

5'-AGCTTggcggcggcagcggcggcggcagcCA-3' [配列番号5]

5'-TATggctgccgcccggctgccgcccA-3' [配列番号6]

このDNA断片を、pETDuet-busGDH-ppuDpの制限酵素Hind IIIおよびNde Iの認識サイトに挿入し、His-busGDHとppuDpがスパーサー配列GGSGGSによって連結された融合タンパク質His-busGDH::ppuDp発現ベクターpETDuet-busGDH::ppuDp [配列番号7]を作製する。

50

【 0 1 3 9 】

次に*Bacillus subtilis* [ATCC 27370]のゲノムDNA鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、805bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCCATGGcgccgatttaaaggaaaagtcgctgcgtattacagga-3' (Nco I) [配列番号 8]

5'-aataatAAGCTTaccgcgccctgcctggaatgaaggatattg-3' (HindIII) [配列番号 2]

このDNA増幅産物を制限酵素Nco IおよびHind IIIで切断し、pCDFDuet-1 (Novagen社製)の同じ制限酵素サイトに挿入し、busGDH発現ベクターpCDFDuet-busGDHを作製する。

【 0 1 4 0 】

次に*Pseudomonas putida* KT2440 [ATCC 47054]のゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、729bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCATATGcttgtgaatgtactgatcgtccacgctcac-3' (NdeI) [配列番号 3]

5'-aataatCTCGAGtcacgtcagcgggtacaacgcttcatcgaa-3' (XhoI) [配列番号 4]

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pCDFDuet-busGDHの同じ制限酵素サイトに挿入し、busGDH、ppuDp共発現ベクターpCDFDuet-busGDH-ppuDp [配列番号 9]を作製する。

【 0 1 4 1 】

発現ベクターpETDuet-busGDH:ppuDpおよびpCDFDuet-busGDH-ppuDpにより、常法に従い*E. coli* BL21(DE3)を形質転換する。形質転換体は抗生物質アンピシリンおよびストレプトマイシンに対する耐性株として選別することができる。

【 0 1 4 2 】

得られた形質転換体を抗生物質アンピシリン及びストレプトマイシンを添加したLB培地10mLで一晩プレ・カルチャー(前培養)した。その後、その0.2mLを、100mLのLB-Amp培地に添加し、30、170rpmで4時間振とう培養する。その後IPTGを添加(終濃度1mM)し、37で412時間培養を続ける。IPTG誘導した形質転換体を集菌(8000×g、2分、4)し、1/10量の4PBSに再懸濁する。凍結融解およびソニケーションにより菌体を破碎し、遠心(8000×g、10分、4)して固形夾雑物を取り除く。目的の発現タンパク質が上清に存在することをSDS-PAGEで確認した後、誘導発現されたHisタグ融合タンパク質をニッケルキレートカラムを用いて精製する。

【 0 1 4 3 】

(比較例1:対照としてのbusGDHおよびppuDpの調製)

Bacillus subtilis [ATCC 27370]から常法に従いゲノムDNAを調製する。このゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、約800bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCATatgtatccggatttaaaggaaaagtcgctgcgt-3' (NdeI) [配列番号 1 2]

5'-aataatCTCGAGaccgcgccctgcctggaatgaaggatattg-3' (XhoI) [配列番号 1 3]

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pET-21a(+) (Novagen社製)の同じ制限酵素サイトに挿入し、busGDH-His発現ベクターpET21-busGDHを作製する。

【 0 1 4 4 】

次に*Pseudomonas putida* KT2440 [ATCC 47054]から常法に従いゲノムDNAを調製する。このゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、729bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCATATGcttgtgaatgtactgatcgtccacgctcac-3' (NdeI) [配列番号 3]

5'-aataatCTCGAGcgtcagcgggtacaacgcttcatcgaa-3' (XhoI) [配列番号 1 4]

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pET-21a(+) (Novagen社製)の同じ制限酵素サイトに挿入し、ppuDp-His発現ベクターpET21-ppuDpを作製する。

【 0 1 4 5 】

発現ベクターpET21-busGDHおよびpET21-ppuDpをそれぞれ個別に用い、*E. coli* BL21(DE3)を常法に従い形質転換する。形質転換体は抗生物質アンピシリンに対する耐性株として選別することができる。

【 0 1 4 6 】

10

20

30

40

50

得られたそれぞれの形質転換体を抗生物質アンピシリンを添加したLB培地10mLで一晩ブレ・カルチャーした後、その0.2mLを、100mLのLB-Amp培地に添加し、30、170rpmで4時間振とう培養する。その後IPTGを添加（終濃度1mM）し、37で412時間培養を続ける。IPTG誘導した形質転換体を集菌（8000×g、2分、4）し、1/10量の4PBSに再懸濁する。凍結融解およびソニケーションにより菌体を破砕し、遠心（8000×g、10分、4）して固形夾雑物を取り除く。目的の発現タンパク質が上清に存在することをSDS-PAGEで確認した後、それぞれの誘導発現されたHisタグ融合タンパク質をニッケルキレートカラムを用いて精製する。

【0147】

（実施例2：グルコースセンサー）

図10および図8を用いて実施例2を説明する。実施例2にかかるセンサーは試料溶液中のグルコースを定量するグルコースセンサーである。実施例2に係るグルコースセンサーの酵素電極部を図10を用いて説明する。酵素電極部は以下の構成からなる。

10

【0148】

導電性基体20は直径3mmのグラッシカーボンである。導電性基体20上に、融合タンパク質（His-busGDH::ppuDp）、及びフェロセン結合ポリアリルアミン（Fc-PAA）がPoly(ethylene glycol) diglycyl etherにより架橋されて固定されている。この融合タンパク質は、実施例1で調製したBacillus subtilis由来のグルコースデヒドロゲナーゼ（busGDH）とPseudomonas putida由来のジアフォラーゼ（ppuDp）との融合タンパク質である。なお、Poly(ethylene glycol) diglycyl etherは以下PEGDEと略称する。

20

【0149】

各成分は、それぞれ、以下の最適の濃度により固定されている。すなわちHis-busGDH::ppuDp（busGDH：0.3ユニット、ppuDp：0.6ユニット）、Fc-PAA：16μg、PEGDE：10μgで調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で2時間以上放置、乾燥させることにより行う。

【0150】

この酵素電極部を、図8における作用電極4として用いることによってグルコースセンサーを構成する。対極5は白金線、参照極6は銀/塩化銀電極で構成する。これらの電極は、それぞれポテンショスタット10を介して電流などを測定する。試料溶液3としては、所定濃度のグルコース、および1mM NADを含む0.1M PIPES-NaOH緩衝水溶液（pH7.5）を用いる。測定温度は、恒温循環槽によって37に保持される。

30

【0151】

前述のグルコースセンサーを用いて次のように定量を行う。作用電極4には参照極6に対して300mVの電位を印加する。このとき、試料溶液3中のグルコースはグルコースデヒドロゲナーゼの存在下でグルコノラクトンに酸化され、この反応でNADがNADHに還元される。次に前記グルコースデヒドロゲナーゼに融合したジアフォラーゼの存在下でNADHはNADに酸化される。この反応で電子伝達メディエータであるフェロセンが酸化され、フェリシニウムイオンが生成される。（作用電極4には参照極6に対して300mVの電位が印加されているため、）フェリシニウムイオンは作用電極4から電子を受けとりフェロセンに還元される。作用電極4での電子の移動による電流を測定することにより、試料溶液中のグルコース濃度を測定する。

40

【0152】

実施例2における測定結果の傾向の一例を図11に示す。図11の実線Aは、前記作用電極4において測定された還元電流の変化量とグルコース濃度の関係図である。図11より、還元電流の変化量とグルコース濃度は、良好な比例関係を示すことが確認される。よって実施例2のグルコースセンサーを用いてグルコースを正確に定量できる。

（比較例2：グルコースセンサー）

図12および図8を用いて比較例2を説明する。比較例2にかかるセンサーは試料溶液中のグルコースを定量するグルコースセンサーである。比較例2に係るグルコースセンサ

50

一の酵素電極部を図 1 2 を用いて説明する。

【 0 1 5 3 】

酵素電極部は以下の構成からなる。導電性基体 2 0 は直径 3 m m のグラッシーカーボンである。導電性基体 2 0 上にグルコースデヒドロゲナーゼ (busGDH)、ジアフォラーゼ (ppuDp)、及びフェロセン結合ポリアリルアミン (Fc - PAA) が PEGDE により架橋されて固定されている。グルコースデヒドロゲナーゼ (busGDH) は、比較例 1 で調製した *Bacillus subtilis* 由来のグルコースデヒドロゲナーゼである。ジアフォラーゼ (ppuDp) は、*Pseudomonas putida* 由来のジアフォラーゼである。各成分は各成分は、それぞれ以下の最適の濃度により固定されている。すなわち busGDH : 0 . 3 ユニット、ppuDp : 0 . 6 ユニット、Fc-PAA : 1 6 μ g、PEGDE : 1 0 μ g で調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で 2 時間以上放置、乾燥させることにより行う。

10

【 0 1 5 4 】

この酵素電極部を、図 8 における作用電極 4 として用いることによってグルコースセンサーを構成し、実施例 2 と同様に、測定すると、図 1 1 の B の傾向を示す。

【 0 1 5 5 】

実施例 2 と比較例 2 から、実施例 2 のグルコースセンサーの方が、比較例 2 のグルコースセンサーよりも、グルコース濃度に対する感度が高く、より低濃度のグルコースを定量出来ることが明らかとなった。酵素電極上に固定されているグルコースデヒドロゲナーゼ及びジアフォラーゼの量は同じにもかかわらず、実施例 2 の酵素電極においては、グルコースデヒドロゲナーゼとジアフォラーゼが融合しているために、両酵素が物理的の近傍に保持されている。このため、NAD / NADH を介した両酵素間の電子授受が速やかに行われるためと考えられる。

20

【 0 1 5 6 】

(実施例 3 : グルコース燃料電池)

図 1 0 及び図 9 を用いて実施例 3 を説明する。実施例 3 にかかる燃料電池はグルコースを燃料とするグルコース燃料電池である。実施例 3 に係るグルコース燃料電池のアノード電極部を図 1 0 を用いて説明する、アノード電極部は以下の構成からなる。

【 0 1 5 7 】

導電性基体 2 0 は 0 . 5 cm^2 のグラッシーカーボンである。導電性基体 2 0 上に実施例 1 で調製した融合タンパク質 (His-busGDH::ppuDp)、及びフェロセン結合ポリアリルアミン (Fc - PAA) が PEGDE により架橋されて固定されている。各成分は、各成分は、それぞれ以下の最適の濃度比により導電性基体 2 0 上に固定されている。His-busGDH::ppuDp (busGDH : 0 . 3 ユニット、ppuDp : 0 . 6 ユニット)、Fc-PAA : 1 6 μ g、PEGDE : 1 0 μ g で調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で 2 時間以上放置、乾燥させることにより行う。

30

【 0 1 5 8 】

実施例 3 に係るグルコース燃料電池のカソード電極 1 6 は 0 . 5 cm^2 の白金板からなる。電解質溶液 3 は、1 0 0 m M 塩化ナトリウム、5 m M グルコース、および 1 m M ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを含む 5 0 m M リン酸緩衝液 (p H 7 . 5) である。前記アノード電極 1 5 とカソード電極 1 6 は、間に多孔質ポリプロピレンフィルム (厚さ 2 0 μ m) 1 7 を挟んで配置され、これを蓋 2 付のウォータージャケットセル 1 中の前記電解液溶液 3 中 (1 0 m L) に配置する。測定温度は、恒温循環槽によって 3 7 $^{\circ}\text{C}$ に保持される。それぞれのリードをポテンショスタット (東方技研、モデル 2 0 0 0) 1 0 に接続し、- 1 . 2 V から 0 . 1 V まで電圧を変化させ、電圧 - 電流特性を測定した。

40

短絡電流密度 : 9 8 7 μ A / cm^2

最大電力 : 1 0 0 μ W / cm^2

の電池出力が観測される。

【 0 1 5 9 】

(比較例 3 : グルコース燃料電池)

図 1 2 及び図 9 を用いて比較例 3 を説明する。比較例 3 にかかる燃料電池はグルコース

50

を燃料とするグルコース燃料電池である。比較例 3 に係るグルコース燃料電池のアノード電極部を図 1 2 を用いて説明する、アノード電極部は以下の構成からなる。

【 0 1 6 0 】

導電性基体 2 0 は 0.5 cm^2 のグラッシーカーボンである。導電性基体 2 0 上にグルコースデヒドロゲナーゼ (busGDH)、ジアフォラーゼ (ppuDp)、及びフェロセン結合ポリアリルアミン (Fc - PAA) が PEGDE により架橋されて固定されている。グルコースデヒドロゲナーゼ (busGDH) は、比較例 1 で調製した *Bacillus subtilis* 由来のグルコースデヒドロゲナーゼである。ジアフォラーゼ (ppuDp) は、*Pseudomonas putida* 由来のジアフォラーゼである。各成分は、各成分は、それぞれ以下の最適の濃度により導電性基体 2 0 上に固定されている。すなわち、busGDH : 0 . 3 ユニット、ppuDp : 0 . 6 ユニット、Fc-PA 10
A : $16 \mu\text{g}$ 、PEGDE : $10 \mu\text{g}$ で調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で 2 時間以上放置、乾燥させることにより行う。

【 0 1 6 1 】

実施例 3 と同様に、電圧 - 電流特性を測定した。

短絡電流密度 : $296 \mu\text{A} / \text{cm}^2$

最大電力 : $31 \mu\text{W} / \text{cm}^2$

の電池出力が観測される。

【 0 1 6 2 】

実施例 3 と比較例 3 から、実施例 3 のグルコース燃料電池の方が、比較例 3 のグルコース燃料電池よりも、電流密度が高く、より大きな電流を取り出せることが明らかとなった 20
。酵素電極上に固定されているグルコースデヒドロゲナーゼ及びジアフォラーゼの量は同じであるにもかかわらず、実施例 3 の燃料電池においては、グルコースデヒドロゲナーゼとジアフォラーゼが融合しているために、両酵素が物理的近傍に保持されている。このため、NAD / NADH を介した両酵素間の電子授受が速やかに行われるためと考えられた。

【 0 1 6 3 】

(実施例 4 : グルコース電気化学反応装置)

図 1 0 および図 8 を用いて実施例 4 を説明する。実施例 4 にかかる電気化学反応装置はグルコースを基質としてグルコノラクトンを生産するグルコース電気化学反応装置である

。実施例 4 に係るグルコース電気化学反応装置の酵素電極部を図 1 0 を用いて説明する。酵素電極部は以下の構成からなる。導電性基体 2 0 は 0.5 cm^2 のグラッシーカーボンである。導電性基体 2 0 上に実施例 1 で調製した融合タンパク質 (His-busGDH::ppuDp)、及びフェロセン結合ポリアリルアミン (Fc - PAA) が PEGDE により架橋されて固定されている。各成分は、各成分は、それぞれ以下の最適の濃度により固定されている。すなわち His-busGDH::ppuDp (busGDH : 0 . 3 ユニット、ppuDp : 0 . 6 ユニット)、Fc-PAA : $16 \mu\text{g}$ 、PEGDE : $10 \mu\text{g}$ で調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で 2 時間以上放置、乾燥させることにより行う。 30

【 0 1 6 4 】

この酵素電極を図 8 における作用電極 4 として用いることによってグルコース電気化学反応装置を構成する。銀塩化銀電極を参照電極 6 に、白金線を対極 5 とした三極セルを構成する。100 mM 塩化ナトリウム、5 mM グルコース、および 1 mM ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7 . 5) 電解液を試料溶液 3 として使用する。恒温循環槽によって 37 °C に保持し、ウォータージャケットセル 1 中窒素雰囲気下 0 . 3 V v s A g / A g C l の電位を 100 分間印加し、生成物を高速液体クロマトグラフィーで定量する。 40

【 0 1 6 5 】

反応電解液からは、グルコノラクトンが検出され、反応電荷量と、生成グルコノラクトン量には、高い相関関係があり、反応が定量的に進行することがわかる。

【 0 1 6 6 】

(比較例 4 : グルコース電気化学反応装置)

図12および図8を用いて比較例4を説明する。比較例4にかかる電気化学反応装置はグルコースを基質としてグルコノラクトンを生産するグルコース電気化学反応装置である。比較例4にかかるグルコース電気化学反応装置の酵素電極部を図12を用いて説明する。

【0167】

酵素電極部は以下の構成からなる。導電性基体20は 0.5 cm^2 のグラッシーカーボンである。導電性基体20上にグルコースデヒドロゲナーゼ (busGDH)、ジアフォラーゼ (ppuDp)、及びフェロセン結合ポリアリルアミン (Fc-PAA) がPEGDEにより架橋されて固定されている。グルコースデヒドロゲナーゼ (busGDH) は比較例1で調製した *Bacillus subtilis* 由来のグルコースデヒドロゲナーゼである。ジアフォラーゼ (ppuDp) は、*Pseudomonas putida* 由来のジアフォラーゼである。各成分は、各成分は、それぞれ以下の最適の濃度により固定されている。すなわち busGDH: 0.3 ユニット、ppuDp: 0.6 ユニット、Fc-PAA: $16\ \mu\text{g}$ 、PEGDE: $10\ \mu\text{g}$ で調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で2時間以上放置、乾燥させることにより行う。

10

【0168】

この酵素電極を、実施例4と同様に、生成物を高速液体クロマトグラフィーで定量する。

【0169】

反応電解液からは、グルコノラクトンが検出され、反応電荷量と、生成グルコノラクトン量には、高い相関関係があり、反応が定量的に進行することがわかる。しかしながら実施例4の場合よりも単位時間あたりの反応電荷量は小さい値であることがわかる。実施例4と比較例4から、実施例4のグルコース電気化学反応装置の方が、比較例4のグルコース電気化学反応装置よりも、単位時間あたりの反応電荷量が高く、より効率的にグルコースをグルコノラクトンに変換出来ることが明らかとなる。酵素電極上に固定されているグルコースデヒドロゲナーゼ及びジアフォラーゼの量は同じにもかかわらず、実施例4の電気化学反応装置においては、グルコースデヒドロゲナーゼとジアフォラーゼが融合しているために、両酵素が物理的の近傍に保持されている。このため、NAD/NADHを介した両酵素間の電子授受が速やかに行われるためと考えられた。

20

(実施例5: *Pyrococcus furiosus* 由来のグルコースデヒドロゲナーゼ (pfuGDH) と *Pyrococcus horikoshii* 由来のジアフォラーゼ (phoDp) との融合タンパク質 (His-pfuGDH::phoDp) [配列番号22、23]の調製)

30

Pyrococcus furiosus [ATCC 43587]から常法に従いゲノムDNAを調製する。このゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、 799 bp のDNA増幅産物を得る。

5'-aataatGGATCCGaacattttaataacagcttcttcaagagga-3' (BamHI) [配列番号15]

5'-aataatAAGCTTaagaagaacgctcctagtcattgctccatc-3' (HindIII) [配列番号16]

このDNA増幅産物を制限酵素BamHIおよびHind IIIで切断し、pETDuet-1(Novagen社製)の同じ制限酵素サイトに挿入し、His-pfuGDH発現ベクターpETDuet-pfuGDHを作製する。

【0170】

40

次に *Pyrococcus horikoshii* KT2440 [ATCC 700860]から常法に従いゲノムDNAを調製する。このゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、 1344 bp のDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCATATGaagatagtagttataggatctggaactgct-3' (NdeI) [配列番号17]

5'-aataatCTCGAGtcatgacttaaattttctcatggccatttc-3' (XhoI) [配列番号18]

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pETDuet-pfuGDHの同じ制限酵素サイトに挿入し、His-pfuGDH、phoDp共発現ベクターpETDuet-pfuGDH-phoDpを作製する。

【0171】

次に、以下の5'末端リン酸化合成オリゴDNAをTEバッファー中で、等量混合し、加熱後

50

徐冷することによってアニーリングする。

5'-AGCTTggcggcgagcggcgggcggcagcCA-3' [配列番号 5]

5'-TATggctgccgcccgcgctgccgcccA-3' [配列番号 6]

このDNA断片を、pETDuet-pfuGDH-phoDpの制限酵素Hind IIIおよびNde Iの認識サイトに挿入する。このことによって、His-pfuGDHとphoDpがスパーサー配列GGGSGGGSによって連結された融合タンパク質His-pfuGDH::phoDp発現ベクターpETDuet-pfuGDH::phoDp [配列番号 19]を作製する。

【0172】

次にPyrococcus furiosus [ATCC 43587]のゲノムDNA鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、797bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCCATGGcgattttaataacagcttcttcaagaggaataggcttc-3' (Nco I) [配列番号 20]

5'-aataatAAGCTTaagaagaacgctcctagtcattgctccatc-3' (HindIII) [配列番号 16]

このDNA増幅産物を制限酵素Nco IおよびHind IIIで切断し、pCDFDuet-1 (Novagen社製)の同じ制限酵素サイトに挿入し、pfuGDH発現ベクターpCDFDuet-pfuGDHを作製する。

【0173】

次にPyrococcus horikoshii KT2440 [ATCC 700860]のゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、1344bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCATATGaagatagtagttataggatctggaactgct-3' (NdeI) [配列番号 17]

5'-aataatCTCGAGTcatgacttaaattttctcatggccatttc-3' (XhoI) [配列番号 18]

このDNA増幅産物を制限酵素Nde I及びXho Iで切断し、pCDFDuet-pfuGDHの同じ制限酵素サイトに挿入し、pfuGDH、phoDp共発現ベクターpCDFDuet-pfuGDH-phoDp [配列番号 21]を作製する。

【0174】

発現ベクターpETDuet-pfuGDH::phoDpおよびpCDFDuet-pfuGDH-phoDpを用い、常法に従いE.coli BL21(DE3)を形質転換する。形質転換体は抗生物質アンピシリンおよびストレプトマイシンに対する耐性株として選別することができる。

【0175】

得られた形質転換体を抗生物質アンピシリン及びストレプトマイシンを添加したLB培地10mLで一晩プレ・カルチャーした後、その0.2mLを、100mLのLB-Amp培地に添加し、30、170rpmで4時間振とう培養する。その後IPTGを添加(終濃度1mM)し、37℃で412時間培養を続ける。IPTG誘導した形質転換体を集菌(8000×g、2分、4℃)し、1/10量の4℃PBSに再懸濁する。凍結融解およびソニケーションにより菌体を破碎し、遠心(8000×g、10分、4℃)して固形夾雑物を取り除く。目的の発現タンパク質が上清に存在することをSDS-PAGEで確認した後、誘導発現されたHisタグ融合タンパク質をニッケルキレートカラムを用いて精製する。

【0176】

こうして得られた融合タンパク質は、例えばグルコースセンサー、グルコース燃料電池、グルコース電気化学反応装置、に適用できる。

(比較例5:対照としてのpfuGDHおよびphoDpの調製)

Pyrococcus furiosus [ATCC 43587]から常法に従いゲノムDNAを調製する。このゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、約800bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCATatgaacattttaataacagcttcttcaagagga-3' (NdeI)[配列番号 24]

5'-aataatCTCGAGaagaagaacgctcctagtcattgctccatc-3' (XhoI)[配列番号 25]

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pET-21a(+)(Novagen社製)の同じ制限酵素サイトに挿入し、pfuGDH-His発現ベクターpET21-pfuGDHを作製する。

【0177】

次にPyrococcus horikoshii KT2440 [ATCC 700860]から常法に従いゲノムDNAを調製す

10

20

30

40

50

る。このゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、1344bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCATATGaagatagtagttataggatctggaactgct-3' (NdeI) [配列番号17]

5'-aataatCTCGAGtgacttaaattttctcatggccatttc-3' (XhoI) [配列番号26]

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pET-21a(+) (Novagen社製)の同じ制限酵素サイトに挿入し、phoDp-His発現ベクターpET21-phoDpを作製する。

【0178】

発現ベクターpET21-pfuGDHおよびpET21-phoDpをそれぞれ個別に用い、E.coli BL21(DE3)を常法に従い形質転換する。形質転換体は抗生物質アンピシリンに対する耐性株として選別することができる。

10

【0179】

得られたそれぞれの形質転換体を抗生物質アンピシリンを添加したLB培地10mLで一晩ブレ・カルチャーした後、その0.2mLを、100mLのLB-Amp培地に添加し、30、170rpmで4時間振とう培養する。その後、実施例5と同様に精製する。

(実施例6：グルコースセンサー)

図10および図8を用いて実施例2を説明する。実施例2にかかるセンサーは試料溶液中のグルコースを定量するグルコースセンサーである。実施例6に係るグルコースセンサーの酵素電極部を図10を用いて説明する。酵素電極部は以下の構成からなる。

【0180】

導電性基体20は直径3mmのグラッシーカーボンである。導電性基体20上に実施例5で調製した融合タンパク質(His-pfuGDH::phoDp)、及びフェロセン結合ポリアリルアミン(Fc-PAA)がPEGDEにより架橋されて固定されている。各成分は各成分は、それぞれ以下の最適の濃度により固定されている。すなわちHis-pfuGDH::phoDp(pfuGDH:0.3ユニット、phoDp:0.6ユニット)、Fc-PAA:16μg、PEGDE:10μgで調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で2時間以上放置、乾燥させることにより行う。

20

【0181】

この酵素電極部を、実施例2と同様に測定する。図11のCの傾向を示す。すなわち、Aよりも傾きが大きい。

30

(比較例6：グルコースセンサー)

図12および図8を用いて比較例6を説明する。比較例6にかかるセンサーは試料溶液中のグルコースを定量するグルコースセンサーである。比較例6に係るグルコースセンサーの酵素電極部を図12を用いて説明する。

【0182】

酵素電極部は以下の構成からなる。導電性基体20は直径3mmのグラッシーカーボンである。導電性基体20上にグルコースデヒドロゲナーゼ(pfuGDH)、Pyrococcus horikoshii由来のジアフォラーゼ(phoDp)、及びフェロセン結合ポリアリルアミン(Fc-PAA)がPEGDEにより架橋されて固定されている。グルコースデヒドロゲナーゼ(pfuGDH)は、比較例5で調製したPyrococcus furiosus由来のグルコースデヒドロゲナーゼである。各成分は、各成分は、それぞれ以下の最適の濃度により固定されている。すなわちpfuGDH:0.3ユニット、phoDp:0.6ユニット、Fc-PAA:16μg、PEGDE:10μgで調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で2時間以上放置、乾燥させることにより行う。

40

【0183】

この酵素電極部を、実施例6と同様に測定する。図11のDの傾向を示す。傾きとしてBよりも大きくなる。

(実施例7：グルコース燃料電池)

50

図10及び図9を用いて実施例7を説明する。実施例7にかかる燃料電池はグルコースを燃料とするグルコース燃料電池である。実施例7に係るグルコース燃料電池のアノード電極部を図10を用いて説明する、アノード電極部は以下の構成からなる。

【0184】

導電性基体20は 0.5 cm^2 のグラッシーカーボンである。導電性基体20上に実施例5で調製した融合タンパク質(His-pfuGDH::phoDp)、及びフェロセン結合ポリアリルアミン(Fc-PAA)がPEGDEにより架橋されて固定されている。各成分は、各成分は、それぞれ以下の最適の濃度比により導電性基体20上に固定されている。すなわち、His-pfuGDH::phoDp(pfuGDH:0.3ユニット、phoDp:0.6ユニット)、Fc-PAA:16 μg 、PEGDE:10 μg で調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で2時間以上放置、乾燥させることにより行う。

10

【0185】

実施例7に係るグルコース燃料電池のカソード電極16は 0.5 cm^2 の白金板からなる。電解質溶液3は、100mM塩化ナトリウム、5mMグルコース、および1mMニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを含む50mMリン酸緩衝液(pH7.5)である。アノード電極15とカソード電極16は、間に多孔質ポリプロピレンフィルム(厚さ20 μm)17を挟んで配置され、これを蓋2付のウォータージャケットセル1中の前記電解液溶液3中(10mL)に配置する。測定温度は、恒温循環槽によって75に保持される。それぞれのリードをポテンショスタット(東方技研、モデル2000)10に接続し、-1.2Vから0.1Vまで電圧を変化させ、電圧-電流特性を測定した。

20

短絡電流密度:1320 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$

最大電力:70125 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$

の電池出力が観測される。

(比較例7:グルコース燃料電池)

図12及び図9を用いて比較例7を説明する。比較例7にかかる燃料電池はグルコースを燃料とするグルコース燃料電池である。比較例7に係るグルコース燃料電池のアノード電極部を図12を用いて説明する、アノード電極部は以下の構成からなる。

【0186】

導電性基体20は 0.5 cm^2 のグラッシーカーボンである。導電性基体20上にグルコースデヒドロゲナーゼ(pfuGDH)、Pyrococcus horikoshii由来のジアフォラーゼ(phoDp)、及びフェロセン結合ポリアリルアミン(Fc-PAA)がPEGDEにより架橋されて固定されている。グルコースデヒドロゲナーゼ(pfuGDH)は比較例5で調製したPyrococcus furiosus由来のグルコースデヒドロゲナーゼである。各成分は各成分は、それぞれ以下の最適の濃度により導電性基体20上に固定されている。すなわち、pfuGDH:0.3ユニット、phoDp:0.6ユニット、Fc-PAA:16 μg 、PEGDE:10 μg で調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で2時間以上放置、乾燥させることにより行う。

30

【0187】

比較例7に係るグルコース燃料電池について、実施例7と同様に測定する。

短絡電流密度:422 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$

最大電力:40 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$

の電池出力が観測される。

40

【0188】

実施例7と比較例7から、実施例7のグルコース燃料電池の方が、比較例7のグルコース燃料電池よりも、電流密度が高く、より大きな電流を取り出せることが明らかとなった。酵素電極上に固定されているグルコースデヒドロゲナーゼ及びジアフォラーゼの量は同じであるにもかかわらず、実施例7の燃料電池においては、グルコースデヒドロゲナーゼとジアフォラーゼが融合しているために、両酵素が物理的近傍に保持されている。このため、NAD/NADHを介した両酵素間の電子授受が速やかに行われるためと考えられた。

【0189】

50

(実施例 8 : グルコース電気化学反応装置)

図 10 および図 8 を用いて実施例 8 を説明する。実施例 8 にかかる電気化学反応装置はグルコースを基質としてグルコノラクトンを生産するグルコース電気化学反応装置である。実施例 8 に係るグルコース電気化学反応装置の酵素電極部を図 10 を用いて説明する。酵素電極部は以下の構成からなる。

【0190】

導電性基体 20 は 0.5 cm^2 のグラッシーカーボンである。導電性基体 20 上に実施例 5 で調製した融合タンパク質 (His-pfuGDH::phoDp)、及びフェロセン結合ポリアリルアミン (Fc-PAA) が PEGDE により架橋されて固定されている。各成分は、各成分は、それぞれ以下の最適の濃度により固定されている。すなわち His-pfuGDH::phoDp (pfuGDH: 0.3 ユニット、phoDp: 0.6 ユニット)、Fc-PAA: $16 \mu\text{g}$ 、PEGDE: $10 \mu\text{g}$ で調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で 2 時間以上放置、乾燥させることにより行う。

10

【0191】

この酵素電極を用いて、実施例 4 と同様に、生成物を高速液体クロマトグラフィーで定量する。反応電解液からは、グルコノラクトンが検出され、反応電荷量と、生成グルコノラクトン量には、高い相関関係があり、反応が定量的に進行することがわかる。

【0192】

(比較例 8 : グルコース電気化学反応装置)

図 12 および図 8 を用いて比較例 8 を説明する。比較例 8 にかかる電気化学反応装置はグルコースを基質としてグルコノラクトンを生産するグルコース電気化学反応装置である。比較例 8 にかかるグルコース電気化学反応装置の酵素電極部を図 12 を用いて説明する。酵素電極部は以下の構成からなる。

20

【0193】

導電性基体 20 は 0.5 cm^2 のグラッシーカーボンである。導電性基体 20 上にグルコースデヒドロゲナーゼ (pfuGDH)、Pyrococcus horikoshii 由来のジアフォラーゼ (phoDp)、及びフェロセン結合ポリアリルアミン (Fc-PAA) が PEGDE により架橋されて固定されている。グルコースデヒドロゲナーゼ (pfuGDH) は、比較例 5 で調製した Pyrococcus furiosus 由来のグルコースデヒドロゲナーゼである。各成分は、各成分は、それぞれ以下の最適の濃度により固定されている。すなわち pfuGDH: 0.3 ユニット、phoDp: 0.6 ユニット、Fc-PAA: $16 \mu\text{g}$ 、PEGDE: $10 \mu\text{g}$ で調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で 2 時間以上放置、乾燥させることにより行う。

30

【0194】

この酵素電極を用いて、実施例 8 と同様に、生成物を高速液体クロマトグラフィーで定量する。

【0195】

反応電解液からは、グルコノラクトンが検出され、反応電荷量と、生成グルコノラクトン量には、高い相関関係があり、反応が定量的に進行することがわかる。しかしながら実施例 8 の場合よりも単位時間あたりの反応電荷量は小さい値であることがわかる。

40

【0196】

実施例 8 と比較例 8 から、実施例 8 のグルコース電気化学反応装置の方が、比較例 8 のグルコース電気化学反応装置よりも、単位時間あたりの反応電荷量が高く、より効率的にグルコースをグルコノラクトンに変換出来ることが明らかとなる。酵素電極上に固定されているグルコースデヒドロゲナーゼ及びジアフォラーゼの量は同じであるにもかかわらず、実施例 8 の電気化学反応装置においては、グルコースデヒドロゲナーゼとジアフォラーゼが融合しているために、両酵素が物理的の近傍に保持されている。このため、NAD/NADH を介した両酵素間の電子授受が速やかに行われるためと考えられた。

(実施例 9 : Saccharomyces cerevisiae 由来のアルコールデヒドロゲナーゼ (sceADH))

50

と *Pseudomonas putida* 由来のジアフオーゼ (ppuDp) との融合タンパク質 (His-sceADH: :ppuDp) [配列番号 36、37] の調製)

Saccharomyces cerevisiae [ATCC 47058] から常法に従いゲノムDNAを調製する。このゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、1075bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatGGATCCGccttcgcaagtcattcctgaaaaacaaaag-3' (BamHI) [配列番号 27]

5'-aataatAAGCTTtttagaagtcctcaacaacatatctaccaac-3' (HindIII) [配列番号 28]

このDNA増幅産物を制限酵素BamHIおよびHind IIIで切断し、pETDuet-1(Novagen社製)の同じ制限酵素サイトに挿入し、His-sceADH発現ベクターpETDuet-sceADHを作製する。

【0197】

次に *Pseudomonas putida* KT2440 [ATCC 47054] から常法に従いゲノムDNAを調製する。このゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、729bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCATATGcttgatgaatgtactgatcgtccacgctcac-3' (NdeI) [配列番号 3]

5'-aataatCTCGAGtcacgtcagcgggtacaacgcttcatcgaa-3' (XhoI) [配列番号 4]

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pETDuet-sceADHの同じ制限酵素サイトに挿入し、His-sceADH、ppuDp共発現ベクターpETDuet-sceADH-ppuDpを作製する。

【0198】

次に、以下の5'末端リン酸化合成オリゴDNAをTEバッファー中で、等量混合し、加熱後徐冷することによってアニーリングする。

5'-AGCTTagcggcggcagcggcagcggcggcagcggcCA-3' [配列番号 29]

5'-TATGgccgctgccgcccgtgccgctgccgcccgtA-3' [配列番号 30]

このDNA断片を、pETDuet-sceADH-ppuDpの制限酵素Hind IIIおよびNde Iの認識サイトに挿入し、His-sceADHとppuDpがスペーサー配列SGGSGSGSGGによって連結された融合タンパク質His-sceADH: :ppuDp発現ベクターpETDuet-sceADH: :ppuDp [配列番号 31] を作製する。

【0199】

次に *Saccharomyces cerevisiae* [ATCC 47058] のゲノムDNA鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、1073bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCCATGGcgtcgcaagtcattcctgaaaaacaaaaggct-3' (Nco I) [配列番号 32]

5'-aataatAAGCTTtttagaagtcctcaacaacatatctaccaac-3' (HindIII) [配列番号 28]

このDNA増幅産物を制限酵素Nco IおよびHind IIIで切断し、pCDFDuet-1 (Novagen社製) の同じ制限酵素サイトに挿入し、sceADH発現ベクターpCDFDuet-sceADHを作製する。

【0200】

次に *Pseudomonas putida* KT2440 [ATCC 47054] のゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、729bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCATATGcttgatgaatgtactgatcgtccacgctcac-3' (NdeI) [配列番号 3]

5'-aataatCTCGAGtcacgtcagcgggtacaacgcttcatcgaa-3' (XhoI) [配列番号 4]

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pCDFDuet-sceADHの同じ制限酵素サイトに挿入し、sceADH、ppuDp共発現ベクターpCDFDuet-sceADH-ppuDp [配列番号 33] を作製する。

【0201】

発現ベクターpETDuet-sceADH: :ppuDpおよびpCDFDuet-sceADH-ppuDpを用い、常法に従い *E. coli* BL21(DE3) を形質転換する。形質転換体は抗生物質アンピシリンおよびストレプトマイシンに対する耐性株として選別することができる。

【0202】

得られた形質転換体を抗生物質アンピシリン及びストレプトマイシンを添加したLB培地10mLで一晩プレ・カルチャーした後、その0.2mLを、100mLのLB-Amp培地に添加し、30、170rpmで4時間振とう培養する。その後IPTGを添加(終濃度1mM)し、37で412時間培

10

20

30

40

50

養を続ける。IPTG 誘導した形質転換体を集菌 (8000 × g、2分、4) し、1/10 量の 4 PBSに再懸濁する。凍結融解およびソニケーションにより菌体を破砕し、遠心 (8000 × g、10分、4) して固形夾雑物を取り除く。目的の発現タンパク質が上清に存在することを SDS-PAGEで確認した後、誘導発現された His タグ融合タンパク質をニッケルキレートカラムを用いて精製する。

(比較例 9 : 対照としての sceADH および ppuDp の調製)

Saccharomyces cerevisiae [ATCC 47058] から常法に従いゲノム DNA を調製する。このゲノム DNA を鋳型にして、以下の合成オリゴ DNA をプライマーとして用いて PCR を行い、約 1074 bp の DNA 増幅産物を得る。

5'-aataatCATatgccttcgcaagtcatctcctgaaaaacaaaag-3' (NdeI) [配列番号 36]

5'-aataatCTCGAGtttagaagctcaacaacatatctaccaac-3' (XhoI) [配列番号 37]

この DNA 増幅産物を制限酵素 Nde I および Xho I で切断し、pET-21a(+) (Novagen 社製) の同じ制限酵素サイトに挿入し、sceADH-His 発現ベクター-pET21-sceADH を作製する。

【0203】

次に *Pseudomonas putida* KT2440 [ATCC 47054] から常法に従いゲノム DNA を調製する。このゲノム DNA を鋳型にして、以下の合成オリゴ DNA をプライマーとして用いて PCR を行い、729 bp の DNA 増幅産物を得る。

5'-aataatCATATGcttgatgaatgtactgatcgtccacgctcac-3' (NdeI) [配列番号 3]

5'-aataatCTCGAGcgtcagcgggtacaacgcttcacgaa-3' (XhoI) [配列番号 14]

この DNA 増幅産物を制限酵素 Nde I および Xho I で切断し、pET-21a(+) (Novagen 社製) の同じ制限酵素サイトに挿入し、ppuDp-His 発現ベクター-pET21-ppuDp を作製する。

【0204】

発現ベクター-pET21-sceADH および pET21-ppuDp をそれぞれ個別に用い、*E. coli* BL21(DE3) を常法に従い形質転換する。形質転換体は抗生物質アンピシリンに対する耐性株として選別することができる。

【0205】

得られたそれぞれの形質転換体を抗生物質アンピシリンを添加した LB 培地 10mL で一晩ブレ・カルチャーした後、その 0.2mL を、100mL の LB-Amp 培地に添加し、30、170rpm で 4 時間振とう培養する。その後 IPTG を添加 (終濃度 1mM) し、37 で 4 12 時間培養を続ける。IPTG 誘導した形質転換体を集菌 (8000 × g、2分、4) し、1/10 量の 4 PBS に再懸濁する。凍結融解およびソニケーションにより菌体を破砕し、遠心 (8000 × g、10分、4) して固形夾雑物を取り除く。目的の発現タンパク質が上清に存在することを SDS-PAGE で確認した後、それぞれの誘導発現された His タグ融合タンパク質をニッケルキレートカラムを用いて精製する。

(実施例 10 : アルコールセンサー)

図 16 および図 8 を用いて実施例 10 を説明する。実施例 10 にかかるセンサーは試料溶液中のアルコールを定量するアルコールセンサーである。実施例 10 に係るアルコールセンサーの酵素電極部を図 16 を用いて説明する。酵素電極部は以下の構成からなる。

【0206】

導電性基体 20 は直径 3 mm のグラッシカーボンである。導電性基体 20 上に実施例 9 で調製した融合タンパク質 (His-sceADH::ppuDp)、及びフェロセン結合ポリアリルアミン (Fc-PAA) が PEGDE により架橋されて固定されている。各成分は、各成分は、それぞれ以下の最適の濃度により固定されている。すなわち His-sceADH::ppuDp (sceADH: 0.3 ユニット、ppuDp: 0.6 ユニット)、Fc-PAA: 16 μg、PEGDE: 10 μg で調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で 2 時間以上放置、乾燥させることにより行う。

【0207】

10

20

30

40

50

この酵素電極部を、図 8 における作用電極 4 として用いることによってアルコールセンサーを構成する。対極 5 は白金線、参照極 6 は銀 / 塩化銀電極で構成する。これらの電極は、それぞれポテンショスタット 10 を介して電流などを測定する。試料溶液 3 としては、所定濃度のアルコール（エタノール）、および 1 mM NAD を含む 0.1 M PIPES - NaOH 緩衝水溶液（pH 7.5）を用いる。測定温度は、恒温循環槽によって 37 に保持される。

【0208】

前述のアルコールセンサーを用いて次のように定量を行う。作用電極 4 には参照極 6 に対して 300 mV の電位を印加する。このとき、試料溶液 3 中のアルコールはアルコールデヒドロゲナーゼの存在下でアセトアルデヒドに酸化され、この反応で NAD が NADH に還元される。次に前記アルコールデヒドロゲナーゼに融合したジアフォラーゼの存在下で NADH は NAD に酸化され、この反応で電子伝達メディエータであるフェロセンが酸化され、フェリシニウムイオンが生成される。（作用電極 4 には参照極 6 に対して 300 mV の電位が印加されているため、）フェリシニウムイオンは作用電極 4 から電子をうけとりフェロセンに還元される。作用電極 4 での電子の移動による電流を測定することにより、試料溶液中のアルコール濃度を測定する。

10

【0209】

（比較例 10：アルコールセンサー）

図 18 および図 8 を用いて比較例 10 を説明する。比較例 10 にかかるセンサーは試料溶液中のアルコールを定量するアルコールセンサーである。比較例 10 に係るアルコールセンサーの酵素電極部を図 18 を用いて説明する。酵素電極部は以下の構成からなる。

20

【0210】

導電性基体 20 は直径 3 mm のグラッシカーボンである。導電性基体 20 上にアルコールデヒドロゲナーゼ（sceADH）、*Pseudomonas putida* 由来のジアフォラーゼ（ppuDp）、及びフェロセン結合ポリアリルアミン（Fc-PAA）が PEGDE により架橋されて固定されている。アルコールデヒドロゲナーゼ（sceADH）は比較例 9 で調製した *Saccharomyces cerevisiae* 由来のアルコールデヒドロゲナーゼ（sceADH）である。各成分は、各成分は、それぞれ以下の最適の濃度により固定されている。すなわち sceADH：0.3 ユニット、ppuDp：0.6 ユニット、Fc-PAA：16 μ g、PEGDE：10 μ g で調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で 2 時間以上放置、乾燥させること

30

【0211】

この酵素電極部を用いて、アルコールセンサーを構成して実施例 10 と同様に測定を行うと、実施例 10 のセンサーと比較例 10 のセンサー感度の相違は、図 11 の A と B の関係に類似する。

【0212】

（実施例 11：アルコール燃料電池）

図 16 及び図 9 を用いて実施例 11 を説明する。実施例 11 にかかる燃料電池はアルコールを燃料とするアルコール燃料電池である。実施例 11 に係るアルコール燃料電池のアノード電極部を図 16 を用いて説明する、アノード電極部は以下の構成からなる。

40

【0213】

導電性基体 20 は 0.5 cm^2 のグラッシカーボンである。導電性基体 20 上に実施例 9 で調製した融合タンパク質（His-sceADH::ppuDp）、及びフェロセン結合ポリアリルアミン（Fc-PAA）が PEGDE により架橋されて固定されている。各成分は、各成分は、それぞれ以下の最適の濃度比により導電性基体 20 上に固定されている。すなわち、His-sceADH::ppuDp（sceADH：0.3 ユニット、ppuDp：0.6 ユニット）、Fc-PAA：16 μ g、PEGDE：10 μ g で調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で 2 時間以上放置、乾燥させることにより行う。

【0214】

実施例 11 に係るアルコール燃料電池のカソード電極 16 は 0.5 cm^2 の白金板から

50

なる。電解質溶液 3 は、100 mM 塩化ナトリウム、5 mM アルコール（エタノール）、および 1 mM ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを含む 50 mM リン酸緩衝液（pH 7.5）である。アノード電極 15 とカソード電極 16 は、間に多孔質ポリプロピレンフィルム（厚さ 20 μm ）17 を挟んで配置され、これを蓋 2 付のウォータージャケットセル 1 中の前記電解液溶液 3 中（10 mL）に配置する。測定温度は、恒温循環槽によって 37 に保持される。それぞれのリードをポテンショスタット（東方技研、モデル 2000）10 に接続し、-1.2 V から 0.1 V まで電圧を変化させ、電圧 - 電流特性を測定した。

短絡電流密度：820 $\mu\text{A} / \text{cm}^2$

最大電力：79 $\mu\text{W} / \text{cm}^2$

の電池出力が観測される。

（比較例 11：アルコール燃料電池）

図 18 及び図 9 を用いて比較例 11 を説明する。比較例 11 にかかる燃料電池はアルコールを燃料とするアルコール燃料電池である。比較例 11 に係るアルコール燃料電池のアノード電極部を図 18 を用いて説明する、アノード電極部は以下の構成からなる。

【0215】

導電性基体 20 は 0.5 cm^2 のグラッシーカーボンである。導電性基体 20 上にアルコールデヒドロゲナーゼ（sceADH）、*Pseudomonas putida* 由来のジアフォラーゼ（ppuDp）、及びフェロセン結合ポリアリルアミン（Fc-PAA）が PEGDE により架橋されて固定されている。アルコールデヒドロゲナーゼ（sceADH）は、比較例 9 で調製した *Saccharomyces cerevisiae* 由来のアルコールデヒドロゲナーゼである。各成分は、各成分は、それぞれ以下の最適の濃度により導電性基体 20 上に固定されている。すなわち、sceADH：0.3 ユニット、ppuDp：0.6 ユニット、Fc-PAA：16 μg 、PEGDE：10 μg で調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で 2 時間以上放置、乾燥させることにより行う。実施例 11 と同様にして、電圧 - 電流特性を測定した。

短絡電流密度：245 $\mu\text{A} / \text{cm}^2$

最大電力：24 $\mu\text{W} / \text{cm}^2$

の電池出力が観測される。

【0216】

実施例 11 と比較例 11 から、実施例 11 のアルコール燃料電池の方が、比較例 11 のアルコール燃料電池よりも、電流密度が高く、より大きな電流を取り出せることが明らかとなった。酵素電極上に固定されているアルコールデヒドロゲナーゼ及びジアフォラーゼの量は同じであるにもかかわらず、実施例 11 の燃料電池においては、アルコールデヒドロゲナーゼとジアフォラーゼが融合しているために、両酵素が物理的的近傍に保持されている。このため、NAD/NADH を介した両酵素間の電子授受が速やかに行われるためと考えられた。

【0217】

（実施例 12：アルコール電気化学反応装置）

図 16 および図 8 を用いて実施例 12 を説明する。実施例 12 にかかる電気化学反応装置はアルコール（エタノール）を基質としてアセトアルデヒドを生産するアルコール電気化学反応装置である。実施例 12 に係るアルコール電気化学反応装置の酵素電極部を図 16 を用いて説明する。酵素電極部は以下の構成からなる。

【0218】

導電性基体 20 は 0.5 cm^2 のグラッシーカーボンである。導電性基体 20 上に実施例 9 で調製した融合タンパク質（His-sceADH::ppuDp）、及びフェロセン結合ポリアリルアミン（Fc-PAA）が PEGDE により架橋されて固定されている。各成分は、各成分は、それぞれ以下の最適の濃度により固定されている。すなわち His-sceADH::ppuDp（sceADH：0.3 ユニット、ppuDp：0.6 ユニット）、Fc-PAA：16 μg 、PEGDE：10 μg で調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で 2 時間以上放置、乾燥させることにより行う。

10

20

30

40

50

【0219】

この酵素電極を図8における作用電極4として用いることによってアルコール電気化学反応装置を構成する。銀塩化銀電極を参照電極6に、白金線を対極5とした三極セルを構成する。100mM塩化ナトリウム、5mMアルコール、および1mMニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを含む50mMリン酸緩衝液(pH7.5)電解液を試料溶液3として使用する。恒温循環槽によって37℃に保持し、ウォータージャケットセル1中窒素雰囲気下0.3V vs Ag/AgClの電位を100分間印加し、生成物を高速液体クロマトグラフィーで定量する。反応電解液からは、アセトアルデヒドが検出され、反応電荷量と、生成アセトアルデヒド量には、高い相関関係があり、反応が定量的に進行することがわかる。

10

(比較例12:アルコール電気化学反応装置)

図18および図8を用いて比較例12を説明する。比較例4にかかる電気化学反応装置はアルコール(エタノール)を基質としてアセトアルデヒドを生産するアルコール電気化学反応装置である。比較例12にかかるアルコール電気化学反応装置の酵素電極部を図18を用いて説明する。酵素電極部は以下の構成からなる。

【0220】

導電性基体20は0.5cm²のグラッシーカーボンである。導電性基体20上にアルコールデヒドロゲナーゼ(sceADH)、Pseudomonas putida由来のジアフォラーゼ(ppuDp)、及びフェロセン結合ポリアリルアミン(Fc-PAA)がPEGDEにより架橋されて固定されている。アルコールデヒドロゲナーゼ(sceADH)は、比較例9で調製したSaccharomyces cerevisiae由来のアルコールデヒドロゲナーゼ(sceADH)である。各成分は、各成分は、それぞれ以下の最適の濃度により固定されている。すなわちsceADH:0.3ユニット、ppuDp:0.6ユニット、Fc-PAA:16μg、PEGDE:10μgで調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で2時間以上放置、乾燥させることにより行う。

20

【0221】

この酵素電極を用いて、実施例12と同様に、生成物を高速液体クロマトグラフィーで定量する。

【0222】

反応電解液からは、アセトアルデヒドが検出され、反応電荷量と、生成アセトアルデヒド量には、高い相関関係があり、反応が定量的に進行することがわかる。しかしながら実施例12の場合よりも単位時間あたりの反応電荷量は小さい値であることがわかる。

30

【0223】

実施例12と比較例12から、実施例12のアルコール電気化学反応装置の方が、比較例12のアルコール電気化学反応装置よりも、単位時間あたりの反応電荷量が高く、より効率的にアルコールをアセトアルデヒドに変換出来ることが明らかとなる。酵素電極上に固定されているアルコールデヒドロゲナーゼ及びジアフォラーゼの量は同じにもかかわらず、実施例12の電気化学反応装置においては、アルコールデヒドロゲナーゼとジアフォラーゼが融合しているために、両酵素が物理的の近傍に保持されている。このため、NAD/NADHを介した両酵素間の電子授受が速やかに行われるためと考えられた。

40

(実施例13:Pyrococcus furiosus由来のアルコールデヒドロゲナーゼ(pfuADH)とPyrococcus horikoshii由来のジアフォラーゼ(phoDp)との融合タンパク質(His-pfuADH::phoDp)[配列番号43、44]の調製)

Pyrococcus furiosus [ATCC 43587]から常法に従いゲノムDNAを調製する。このゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、1147bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatGGATCCGtttttctctaaagactaagattatcgaggga-3' (BamHI) [配列番号38]

5'-aataatAAGCTTatctccatagaaggccctctcataaattct-3' (HindIII) [配列番号39]

このDNA増幅産物を制限酵素BamHIおよびHind IIIで切断し、pETDuet-1(Novagen社製)の

50

同じ制限酵素サイトに挿入し、His-pfuADH発現ベクターpETDuet-pfuADHを作製する。

【0224】

次にPyrococcus horikoshii KT2440 [ATCC 700860]から常法に従いゲノムDNAを調製する。このゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、1344bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCATATGaagatagtagttataggatctggaactgct-3' (NdeI) [配列番号17]

5'-aataatCTCGAGTcatgacttaaattttctcatggcatttc-3' (XhoI) [配列番号18]

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pETDuet-pfuADHの同じ制限酵素サイトに挿入し、His-pfuADH、phoDp共発現ベクターpETDuet-pfuADH-phoDpを作製する。

10

【0225】

次に以下の5'末端リン酸化合成オリゴDNAをTEバッファー中で、等量混合し、加熱後徐冷することによってアニーリングする。

5'-AGCTTagcggcggcagcggcagcggcggcagcggcCA-3' [配列番号29]

5'-TATGgccgctgccgctgccgctgccgctA-3' [配列番号30]

このDNA断片を、pETDuet-pfuADH-phoDpの制限酵素Hind IIIおよびNde Iの認識サイトに挿入し、His-pfuADHとphoDpがスペーサー配列SGSGSGSGSGによって連結された融合タンパク質His-pfuADH::phoDp発現ベクターpETDuet-pfuADH::phoDp [配列番号40]を作製する。

。

【0226】

次にPyrococcus furiosus [ATCC 43587]のゲノムDNA鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、1145bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCCATGGcgttctctaaagactaagattatcgaggaagg-3' (Nco I) [配列番号41]

5'-aataatAAGCTTatctccatagaaggccctctcataaattct-3' (HindIII) [配列番号39]

このDNA増幅産物を制限酵素Nco IおよびHind IIIで切断し、pCDFDuet-1 (Novagen社製)の同じ制限酵素サイトに挿入し、pfuADH発現ベクターpCDFDuet-pfuADHを作製する。

。

【0227】

次にPyrococcus horikoshii KT2440 [ATCC 700860]のゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、1344bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCATATGaagatagtagttataggatctggaactgct-3' (NdeI) [配列番号17]

5'-aataatCTCGAGTcatgacttaaattttctcatggcatttc-3' (XhoI) [配列番号18]

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pCDFDuet-pfuADHの同じ制限酵素サイトに挿入し、pfuADH、phoDp共発現ベクターpCDFDuet-pfuADH-phoDp [配列番号42]を作製する。

。

【0228】

発現ベクターpETDuet-pfuADH::phoDpおよびpCDFDuet-pfuADH-phoDpを用い常法に従いE. coli BL21(DE3)を形質転換する。形質転換体は抗生物質アンピシリンおよびストレプトマイシンに対する耐性株として選別することができる。

【0229】

得られた形質転換体を抗生物質アンピシリン及びストレプトマイシンを添加したLB培地10mLで一晩プレ・カルチャーした後、その0.2mLを、100mLのLB-Amp培地に添加し、30、170rpmで4時間振とう培養する。その後IPTGを添加(終濃度1mM)し、37で412時間培養を続ける。IPTG誘導した形質転換体を集菌(8000×g、2分、4)し、1/10量の4PBSに再懸濁する。凍結融解およびソニケーションにより菌体を破砕し、遠心(8000×g、10分、4)して固形夾雑物を取り除く。目的の発現タンパク質が上清に存在することをSDS-PAGEで確認した後、誘導発現されたHisタグ融合タンパク質をニッケルキレートカラムを用いて精製する。

こうして得られる好熱菌由来の融合タンパク質を用いて、アルコールセンサーや燃料電池等を上述の実施例同様に作製できる。

30

40

50

(実施例 17 : *Lactobacillus plantarum*由来の乳酸デヒドロゲナーゼ (IpILDH) と *Gluconobacter oxydans*由来のジアフォーゼ (goxDp) との融合タンパク質 (His-IpILDH::goxDp) [配列番号 56、57]の調製)

Lactobacillus plantarum [ATCC 10241]から常法に従いゲノムDNAを調製する。このゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、982 bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatGGATCCGtcaagcatgccaaatcatcaaaaagttgtg-3' (BamHI) [配列番号 47]

5'-aataatAAGCTTtttattttcttaattcagctaaaccgtcgtt-3' (HindIII) [配列番号 48]

10

このDNA増幅産物を制限酵素BamHIおよびHind IIIで切断し、pETDuet-1(Novagen社製)の同じ制限酵素サイトに挿入し、His-IpILDH発現ベクターpETDuet-IpILDHを作製する。

【0230】

次に *Gluconobacter oxydans* [ATCC 621H]から常法に従いゲノムDNAを調製する。このゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、1428 bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCATATGtgcgatacgttcgatctgattgttgttggt-3' (NdeI) [配列番号 49]

5'-aataatCTCGAGtcagatatgcagcgggccgtcgaaggccgc-3' (XhoI) [配列番号 50]

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pETDuet-IpILDHの同じ制限酵素サイトに挿入し、His-IpILDH、goxDp共発現ベクターpETDuet-IpILDH-goxDpを作製する。

20

【0231】

次に以下の5'末端リン酸化合成オリゴDNAをTEバッファー中で、等量混合し、加熱後徐冷することによってアニーリングする。

5'-AGCTTgaaggcaaaagcagcggcagcggcagcgaagcaaaagcaccCA-3' [配列番号 51]

5'-TATGggtgcttttgctttcgcgtccgctgccgctgcttttgcccttCA-3' [配列番号 52]

このDNA断片を、pETDuet-IpILDH-goxDpの制限酵素Hind IIIおよびNde Iの認識サイトに挿入し、His-IpILDHとgoxDpがスペーサー配列EGKSSGSGSESKSTによって連結された融合タンパク質His-IpILDH::goxDp発現ベクターpETDuet-IpILDH::goxDp [配列番号 53]を作製する。

30

【0232】

次に *Lactobacillus plantarum* [ATCC 10241]のゲノムDNA鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、980 bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCCATGGcagcatgccaaatcatcaaaaagttgtgtta-3' (Nco I) [配列番号 54]

5'-aataatAAGCTTtttattttcttaattcagctaaaccgtcgtt-3' (HindIII) [配列番号 48]

このDNA増幅産物を制限酵素Nco IおよびHind IIIで切断し、pCDFDuet-1 (Novagen社製)の同じ制限酵素サイトに挿入し、IpILDH発現ベクターpCDFDuet-IpILDHを作製する。

【0233】

次に *Gluconobacter oxydans* [ATCC 621H]のゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、1428 bpのDNA増幅産物を得る。

40

5'-aataatCATATGtgcgatacgttcgatctgattgttgttggt-3' (NdeI) [配列番号 49]

5'-aataatCTCGAGtcagatatgcagcgggccgtcgaaggccgc-3' (XhoI) [配列番号 50]

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pCDFDuet-IpILDHの同じ制限酵素サイトに挿入し、IpILDH、goxDp共発現ベクターpCDFDuet-IpILDH-goxDp [配列番号 55]を作製する。

【0234】

発現ベクターpETDuet-IpILDH::goxDpおよびpCDFDuet-IpILDH-goxDpを用い、常法に従い *E. coli* BL21(DE3)を形質転換する。形質転換体は抗生物質アンピシリンおよびストレプトマイシンに対する耐性株として選別することができる。

【0235】

50

得られた形質転換体を抗生物質アンピシリン及びストレプトマイシンを添加したLB培地10mLで一晩ブレ・カルチャーした後、その0.2mLを、100mLのLB-Amp培地に添加し、30、170rpmで4時間振とう培養する。その後IPTGを添加（終濃度1mM）し、37℃で4-12時間培養を続ける。IPTG誘導した形質転換体を集菌（8000×g、2分、4℃）し、1/10量の4℃PBSに再懸濁する。凍結融解およびソニケーションにより菌体を破砕し、遠心（8000×g、10分、4℃）して固形夾雑物を取り除く。目的の発現タンパク質が上清に存在することをSDS-PAGEで確認した後、誘導発現されたHisタグ融合タンパク質をニッケルキレートカラムを用いて精製する。

【0236】

（比較例17：対照としてのIpILDHおよびgoxDpの調製）

10

Lactobacillus plantarum [ATCC 10241]から常法に従いゲノムDNAを調製する。このゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、約980bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCATatgtcaagcatgccaaatcatcaaaaagtgtg-3' (NdeI)[配列番号58]

5'-aataatCTCGAGtttattttctaatcagctaaaccgtcgtt-3' (XhoI)[配列番号59]

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pET-21a(+) (Novagen社製)の同じ制限酵素サイトに挿入し、IpILDH-His発現ベクターpET21-IpILDHを作製する。

【0237】

次に*Gluconobacter oxydans* [ATCC 621H]から常法に従いゲノムDNAを調製する。このゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、約1420bpのDNA増幅産物を得る。

20

5'-aataatCATATGtgcgatacgttcgatctgattgttgttgg-3' (NdeI)[配列番号49]

5'-aataatCTCGAGgatatgcagcgggcccgtcgaaggcccag-3' (XhoI)[配列番号60]

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pET-21a(+) (Novagen社製)の同じ制限酵素サイトに挿入し、goxDp-His発現ベクターpET21-goxDpを作製する。

【0238】

発現ベクターpET21-IpILDHおよびpET21-goxDpをそれぞれ個別に、*E. coli* BL21(DE3)を常法に従い形質転換する。形質転換体は抗生物質アンピシリンに対する耐性株として選別することができる。

【0239】

30

得られたそれぞれの形質転換体を抗生物質アンピシリンを添加したLB培地10mLで一晩ブレ・カルチャーした後、その0.2mLを、100mLのLB-Amp培地に添加し、30、170rpmで4時間振とう培養する。その後IPTGを添加（終濃度1mM）し、37℃で4-12時間培養を続ける。IPTG誘導した形質転換体を集菌（8000×g、2分、4℃）し、1/10量の4℃PBSに再懸濁する。凍結融解およびソニケーションにより菌体を破砕し、遠心（8000×g、10分、4℃）して固形夾雑物を取り除く。目的の発現タンパク質が上清に存在することをSDS-PAGEで確認した後、それぞれの誘導発現されたHisタグ融合タンパク質をニッケルキレートカラムを用いて精製する。

【0240】

（実施例18：乳酸センサー）

40

図22および図8を用いて実施例18を説明する。実施例18にかかるセンサーは試料溶液中の乳酸を定量する乳酸センサーである。実施例18に係る乳酸センサーの酵素電極部を図22を用いて説明する。

【0241】

酵素電極部は以下の構成からなる。導電性基体20は直径3mmのグラッシーカーボンである。導電性基体20上に実施例17で調製した融合タンパク質（His-IpILDH::goxDp）、及びフェロセン結合ポリアリルアミン（Fc-PAA）がPEGDEにより架橋されて固定されている。各成分は各成分は、それぞれ以下の最適の濃度により固定されている。すなわちHis-IpILDH::goxDp（IpILDH：0.3ユニット、goxDp：0.6ユニット）、Fc-PAA：16μg、PEGDE：10μgで調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電

50

極上で混合後、室温で2時間以上放置、乾燥させることにより行う。

【0242】

この酵素電極部を、図8における作用電極4として用いることによって乳酸センサーを構成する。対極5は白金線、参照極6は銀/塩化銀電極で構成する。これらの電極は、それぞれポテンショスタット10を介して電流などを測定する。試料溶液3としては、所定濃度の乳酸(L-乳酸)、および1mM NADを含む0.1M PIPES-NaOH緩衝水溶液(pH 7.5)を用いる。測定温度は、恒温循環槽によって30℃に保持される。

【0243】

前述の乳酸センサーを用いて次のように定量を行う。作用電極4には参照極6に対して300mVの電位を印加する。このとき、試料溶液3中の乳酸は乳酸デヒドロゲナーゼの存在下でピルビン酸に酸化され、この反応でNADがNADHに還元される。次に前記乳酸デヒドロゲナーゼに融合したジアフォラーゼの存在下でNADHはNADに酸化され、この反応で電子伝達メディエータであるフェロセンが酸化され、フェリシニウムイオンが生成される。(作用電極4には参照極6に対して300mVの電位が印加されているため、)フェリシニウムイオンは作用電極4から電子を受けとりフェロセンに還元される。作用電極4での電子の移動による電流を測定することにより、試料溶液中の乳酸濃度を測定する。

10

【0244】

(比較例18：乳酸センサー)

図24および図8を用いて比較例18を説明する。比較例18にかかるセンサーは試料溶液中の乳酸を定量する乳酸センサーである。比較例18に係る乳酸センサーの酵素電極部を図24を用いて説明する。

20

【0245】

酵素電極部は以下の構成からなる。導電性基体20は直径3mmのグラッシーカーボンである。導電性基体20上に乳酸デヒドロゲナーゼ(IpILDH)、ジアフォラーゼ(goxDp)、及びフェロセン結合ポリアリルアミン(Fc-PAA)がPEGDEにより架橋されて固定されている。乳酸デヒドロゲナーゼ(IpILDH)は比較例17で調製したLactobacillus plantarum由来の乳酸デヒドロゲナーゼ(IpILDH)である。ジアフォラーゼ(goxDp)は、Gluc onobacter oxydans由来のジアフォラーゼである。各成分は、各成分は、それぞれ以下の最適の濃度により固定されている。すなわちIpILDH：0.3ユニット、goxDp：0.6ユニット、Fc-PAA：16μg、PEGDE：10μgで調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で2時間以上放置、乾燥させることにより行う。

30

【0246】

この酵素電極部を、実施例18と同様に試料溶液中の乳酸濃度を測定する。実施例18の結果と比較例18の結果の相違は、図11のAとBの相違に類似する。

【0247】

実施例18と比較例18から、実施例18の乳酸センサーの方が、比較例18の乳酸センサーよりも、乳酸濃度に対する感度が高く、より低濃度の乳酸を定量出来ることが明らかとなった。酵素電極上に固定されている乳酸デヒドロゲナーゼ及びジアフォラーゼの量は同じであるにもかかわらず、実施例18の酵素電極においては、乳酸デヒドロゲナーゼとジアフォラーゼが融合しているために、両酵素が物理的近傍に保持されている。このため、NAD/NADHを介した両酵素間の電子授受が速やかに行われるためと考えられた。

40

【0248】

(実施例19：乳酸燃料電池)

図22及び図9を用いて実施例19を説明する。実施例19にかかる燃料電池は乳酸を燃料とする乳酸燃料電池である。実施例19に係る乳酸燃料電池のアノード電極部を図22を用いて説明する。

【0249】

アノード電極部は以下の構成からなる。導電性基体20は0.5cm²のグラッシーカーボンである。導電性基体20上に実施例17で調製した融合タンパク質(His-IpILDH::

50

goxDp)、及びフェロセン結合ポリアリルアミン(Fc-PAA)がPEGDEにより架橋されて固定されている。各成分は各成分は、それぞれ以下の最適の濃度比により導電性基体20上に固定されている。すなわち、His-IpILDH::goxDp(IpILDH:0.3ユニット、goxDp:0.6ユニット)、Fc-PAA:16 μ g、PEGDE:10 μ gで調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で2時間以上放置、乾燥させることにより行う。

【0250】

実施例19に係る乳酸燃料電池のカソード電極16は0.5 cm^2 の白金板からなる。電解質溶液3は、100mM塩化ナトリウム、5mM乳酸(L-乳酸)、および1mMニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを含む50mMリン酸緩衝液(pH7.5)である。アノード電極15とカソード電極16は、間に多孔質ポリプロピレンフィルム(厚さ20 μ m)17を挟んで配置され、これを蓋2付のウォータージャケットセル1中の前記電解液溶液3中(10mL)に配置する。測定温度は、恒温循環槽によって30に保持される。それぞれのリードをポテンショスタット(東方技研、モデル2000)10に接続し、-1.2Vから0.1Vまで電圧を変化させ、電圧-電流特性を測定した。

短絡電流密度:1330 μ A/ cm^2

最大電力:120 μ W/ cm^2

の電池出力が観測される。

【0251】

(比較例19:乳酸燃料電池)

図24及び図9を用いて比較例19を説明する。比較例19にかかる燃料電池は乳酸を燃料とする乳酸燃料電池である。比較例19に係る乳酸燃料電池のアノード電極部を図24を用いて説明する。

【0252】

アノード電極部は以下の構成からなる。導電性基体20は0.5 cm^2 のグラッシーカーボンである。導電性基体20上に乳酸デヒドロゲナーゼ(IpILDH)、ジアフォラーゼ(goxDp)、及びフェロセン結合ポリアリルアミン(Fc-PAA)がPEGDEにより架橋されて固定されている。乳酸デヒドロゲナーゼ(IpILDH)は比較例17で調製したLactobacillus plantarum由来の乳酸デヒドロゲナーゼである。ジアフォラーゼ(goxDp)はGluconobacter oxydans由来のジアフォラーゼである。各成分は、各成分は、それぞれ以下の最適の濃度により導電性基体20上に固定されている。すなわち、IpILDH:0.3ユニット、goxDp:0.6ユニット、Fc-PAA:16 μ g、PEGDE:10 μ gで調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で2時間以上放置、乾燥させることにより行う。

【0253】

比較例19に係る乳酸燃料電池のカソード電極を用いて実施例19と同様に、電圧-電流特性を測定した。

短絡電流密度:396 μ A/ cm^2

最大電力:37 μ W/ cm^2

の電池出力が観測される。

【0254】

実施例19と比較例19から、実施例19の乳酸燃料電池の方が、比較例19の乳酸燃料電池よりも、電流密度が高く、より大きな電流を取り出せることが明らかとなった。酵素電極上に固定されている乳酸デヒドロゲナーゼ及びジアフォラーゼの量は同じであるにもかかわらず、実施例19の燃料電池においては、乳酸デヒドロゲナーゼとジアフォラーゼが融合しているために、両酵素が物理的近傍に保持されている。このため、NAD/NADHを介した両酵素間の電子授受が速やかに行われるためと考えられた。

【0255】

(実施例20:乳酸電気化学反応装置)

図22および図8を用いて実施例20を説明する。実施例20にかかる電気化学反応装

10

20

30

40

50

置は乳酸（L 乳酸）を基質としてピルビン酸を生産する乳酸電気化学反応装置である。実施例 20 に係る乳酸電気化学反応装置の酵素電極部を図 22 を用いて説明する。酵素電極部は以下の構成からなる。

【0256】

導電性基体 20 は 0.5 cm^2 のグラッシーカーボンである。導電性基体 20 上に実施例 17 で調製した融合タンパク質（His-IpILDH::goxDp）、及びフェロセン結合ポリアリルアミン（Fc-PAA）が PEGDE により架橋されて固定されている。各成分は、各成分は、それぞれ以下の最適の濃度により固定されている。すなわち His-IpILDH::goxDp（IpILDH：0.3 ユニット、goxDp：0.6 ユニット）、Fc-PAA：16 μg 、PEGDE：10 μg で調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で 2 時間以上放置、乾燥させることにより行う。

10

【0257】

この酵素電極を図 8 における作用電極 4 として用いることによって乳酸電気化学反応装置を構成する。銀塩化銀電極を参照電極 6 に、白金線を対極 5 とした三極セルを構成する。100 mM 塩化ナトリウム、5 mM 乳酸（L 乳酸）、および 1 mM ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを含む 50 mM リン酸緩衝液（pH 7.5）電解液を試料溶液 3 として使用し、恒温循環槽によって 30℃ に保持される。ウォータージャケットセル 1 中窒素雰囲気下 0.3 V vs Ag/AgCl の電位を 100 分間印加し、生成物を高速液体クロマトグラフィーで定量する。

【0258】

反応電解液からは、ピルビン酸が検出され、反応電荷量と、生成ピルビン酸量には、高い相関関係があり、反応が定量的に進行することがわかる。

20

【0259】

（比較例 20：乳酸電気化学反応装置）

図 24 および図 8 を用いて比較例 20 を説明する。比較例 20 にかかる電気化学反応装置は乳酸（L 乳酸）を基質としてピルビン酸を生産する乳酸電気化学反応装置である。比較例 20 にかかる乳酸電気化学反応装置の酵素電極部を図 24 を用いて説明する。

【0260】

酵素電極部は以下の構成からなる。導電性基体 20 は 0.5 cm^2 のグラッシーカーボンである。導電性基体 20 上に乳酸デヒドロゲナーゼ（IpILDH）、ジアフォラーゼ（goxDp）、及びフェロセン結合ポリアリルアミン（Fc-PAA）が PEGDE により架橋されて固定されている。乳酸デヒドロゲナーゼ（IpILDH）は、比較例 17 で調製した *Lactobacillus plantarum* 由来の乳酸デヒドロゲナーゼである。ジアフォラーゼ（goxDp）は *Gluconobacter oxydans* 由来のジアフォラーゼである。各成分は、各成分は、それぞれ以下の最適の濃度により固定されている。すなわち IpILDH：0.3 ユニット、goxDp：0.6 ユニット、Fc-PAA：16 μg 、PEGDE：10 μg で調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で 2 時間以上放置、乾燥させることにより行う。

30

【0261】

この酵素電極を用いて実施例 20 と同様に、生成物を高速液体クロマトグラフィーで定量する。

40

【0262】

反応電解液からは、ピルビン酸が検出され、反応電荷量と、生成ピルビン酸量には、高い相関関係があり、反応が定量的に進行することがわかる。しかしながら実施例 20 の場合よりも単位時間あたりの反応電荷量は小さい値であることがわかる。実施例 20 と比較例 20 から、実施例 20 の乳酸電気化学反応装置の方が、比較例 20 の乳酸電気化学反応装置よりも、単位時間あたりの反応電荷量が高く、より効率的に乳酸をピルビン酸に変換出来ることが明らかとなる。酵素電極上に固定されている乳酸デヒドロゲナーゼ及びジアフォラーゼの量は同じであるにもかかわらず、実施例 20 の電気化学反応装置においては、乳酸デヒドロゲナーゼとジアフォラーゼが融合しているために、両酵素が物理的近傍に保持されている。このため、NAD/NADH を介した両酵素間の電子授受が速やかに行われる

50

ためと考えられた。

(実施例 2 1 : *Thermotoga maritima*由来の乳酸デヒドロゲナーゼ (tmaLDH) と *Thermotoga maritima*由来のジアフオーゼ (tmaDp) との融合タンパク質 (His-tmaLDH::tmaDp) [配列番号 6 8、6 9] の調製)

Thermotoga maritima [ATCC 43589] から常法に従いゲノムDNAを調製する。このゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、979 bp のDNA増幅産物を得る。

5'-aataatGGATCCGaaataggtatcgtaggactcggaagggtt-3' (BamHI) [配列番号 6 1]

5'-aataatAAGCTTaccgctggtgttctggtgcttgttctcttc-3' (HindIII) [配列番号 6 2]

このDNA増幅産物を制限酵素BamHIおよびHind IIIで切断し、pETDuet-1(Novagen社製)の同じ制限酵素サイトに挿入し、His-tmaLDH発現ベクターpETDuet-tmaLDHを作製する。

【0263】

次に *Thermotoga maritima* [ATCC 43589] から常法に従いゲノムDNAを調製する。このゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、1371 bp のDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCATATGtacgatgctgtgatcataggaggaggaccc-3' (NdeI) [配列番号 6 3]

5'-aataatCTCGAGtcacagatgaatgggttttctgagacccc-3' (XhoI) [配列番号 6 4]

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pETDuet-tmaLDHの同じ制限酵素サイトに挿入し、His-tmaLDH、tmaDp共発現ベクターpETDuet-tmaLDH-tmaDpを作製する。

【0264】

次に、以下の5'末端リン酸化合成オリゴDNAをTEバッファー中で、等量混合し、加熱後徐冷することによってアニーリングする。

5'-AGCTTgaaggcaaaagcagcggcagcggcagcgaagcaaaagcaccCA-3' [配列番号 5 1]

5'-TATGggtgcttttgctttcgctgccgctgccgctgcttttgcccttCA-3' [配列番号 5 2]

このDNA断片を、pETDuet-tmaLDH-tmaDpの制限酵素Hind IIIおよびNde Iの認識サイトに挿入し、His-tmaLDHとtmaDpがスペーサー配列EGKSSGSGSESKSTによって連結された融合タンパク質His-tmaLDH::tmaDp発現ベクターpETDuet-tmaLDH::tmaDp [配列番号 6 5] を作製する。

【0265】

次に *Thermotoga maritima* [ATCC 43589] のゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、977 bp のDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCCATGGc gataggtatcgtaggactcggaagggttgg-3' (Nco I) [配列番号 6 6]

5'-aataatAAGCTTatctccatagaaggccctctcataaattct-3' (HindIII) [配列番号 6 2]

このDNA増幅産物を制限酵素Nco IおよびHind IIIで切断し、pCDFDuet-1 (Novagen社製) の同じ制限酵素サイトに挿入し、tmaLDH発現ベクターpCDFDuet-tmaLDHを作製する。

【0266】

次に *Thermotoga maritima* [ATCC 43589] のゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、1371 bp のDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCATATGtacgatgctgtgatcataggaggaggaccc-3' (NdeI) [配列番号 6 3]

5'-aataatCTCGAGtcacagatgaatgggttttctgagacccc-3' (XhoI) [配列番号 6 4]

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pCDFDuet-tmaLDHの同じ制限酵素サイトに挿入し、tmaLDH、tmaDp共発現ベクターpCDFDuet-tmaLDH-tmaDp [配列番号 6 7] を作製する。

【0267】

発現ベクターpETDuet-tmaLDH::tmaDpおよびpCDFDuet-tmaLDH-tmaDpを用い、常法に従い *E. coli* BL21(DE3) を形質転換する。形質転換体は抗生物質アンピシリンおよびストレプトマイシンに対する耐性株として選別することができる。

【0268】

10

20

30

40

50

得られた形質転換体を抗生物質アンピシリン及びストレプトマイシンを添加したLB培地 10mLで一晩ブレ・カルチャーした後、その0.2mLを、100mLのLB-Amp培地に添加し、37℃、170rpmで4時間振とう培養する。その後IPTGを添加（終濃度 1mM）し、37℃で4-12時間培養を続ける。IPTG誘導した形質転換体を集菌（8000×g、2分、4℃）し、1/10量の4×PBSに再懸濁する。凍結融解およびソニケーションにより菌体を破砕し、遠心（8000×g、10分、4℃）して固形夾雑物を取り除く。目的の発現タンパク質が上清に存在することをSDS-PAGEで確認した後、誘導発現されたHisタグ融合タンパク質をニッケルキレートカラムを用いて精製する。

【0269】

こうして得られた好熱菌由来の融合タンパク質は、乳酸センサー等に適用できる。

10

（実施例25：Pseudomonas putida由来のリンゴ酸デヒドロゲナーゼ（ppuMDH）とGluconobacter oxydans由来のジアフォーゼ（goxDp）との融合タンパク質（His-ppuMDH::goxDp）[配列番号78、79]の調製）

Pseudomonas putida [ATCC 47054]から常法に従いゲノムDNAを調製する。このゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、1288bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatGGATCCGtcagacctgaaaaccgcccgtctcgaatat-3' (BamHI) [配列番号73]

5'-aataatAAGCTTgccgttgaacacttcatccacgctggctcag-3' (HindIII) [配列番号74]

このDNA増幅産物を制限酵素BamHIおよびHind IIIで切断し、pETDuet-1(Novagen社製)の同じ制限酵素サイトに挿入し、His-ppuMDH発現ベクターpETDuet-ppuMDHを作製する。

20

【0270】

次にGluconobacter oxydans [ATCC 621H]から常法に従いゲノムDNAを調製する。このゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAとして用いてPCRを行い、1428bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCATATGtgcgatcacgttcgatctgattgttgttgg-3' (NdeI) [配列番号49]

5'-aataatCTCGAGtcagatatgcagcgggcccgtcgaaggccgc-3' (XhoI) [配列番号50]

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pETDuet-ppuMDHの同じ制限酵素サイトに挿入し、His-ppuMDH、goxDp共発現ベクターpETDuet-ppuMDH-goxDpを作製する。

30

【0271】

次に、以下の5'末端リン酸化合成オリゴDNAをTEバッファー中で、等量混合し、加熱後徐冷することによってアニーリングする。

5'-AGCTTgaaggcaaaagcagcggcagcggcagcgaagcaaaagcaccCA-3' [配列番号51]

5'-TATGggtgcttttgctttcgcgtgccgctgccgctgcttttccttcA-3' [配列番号52]

このDNA断片を、pETDuet-ppuMDH-goxDpの制限酵素Hind IIIおよびNde Iの認識サイトに挿入し、His-ppuMDHとgoxDpがスペーサー配列EGKSSGSGSESKSTによって連結された融合タンパク質His-ppuMDH::goxDp発現ベクターpETDuet-ppuMDH::goxDp [配列番号75]を作製する。

【0272】

40

次にPseudomonas putida [ATCC 47054]のゲノムDNA鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、1286bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCCATGGcggacctgaaaaccgcccgtctcgaatatcac-3' (Nco I) [配列番号76]

5'-aataatAAGCTTgccgttgaacacttcatccacgctggctcag-3' (HindIII) [配列番号74]

このDNA増幅産物を制限酵素Nco IおよびHind IIIで切断し、pCDFDuet-1 (Novagen社製)の同じ制限酵素サイトに挿入し、ppuMDH発現ベクターpCDFDuet-ppuMDHを作製する。

【0273】

次にGluconobacter oxydans [ATCC 621H]のゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、1428bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCATATGtgcgatcacgttcgatctgattgttgttgg-3' (NdeI) [配列番号49]

50

5'-aataatCTCGAGtcagatatgcagcgggcccgtcgaaggccgc-3' (XhoI) [配列番号 5 0]

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pCDFDuet-ppuMDHの同じ制限酵素サイトに挿入し、ppuMDH、goxDp共発現ベクターpCDFDuet-ppuMDH-goxDp [配列番号 7 7]を作製する。

【0 2 7 4】

発現ベクターpETDuet-ppuMDH::goxDpおよびpCDFDuet-ppuMDH-goxDpを用い、常法に従いE.coli BL21(DE3)を形質転換する。形質転換体は抗生物質アンピシリンおよびストレプトマイシンに対する耐性株として選別することができる。

【0 2 7 5】

得られた形質転換体を抗生物質アンピシリン及びストレプトマイシンを添加したLB培地 10mLで一晩プレ・カルチャーした後、その0.2mLを、100mLのLB-Amp培地に添加し、30、170rpmで4時間振とう培養する。その後IPTGを添加（終濃度 1mM）し、37℃で4 12時間培養を続ける。IPTG誘導した形質転換体を集菌（8000×g、2分、4℃）し、1/10量の4℃PBSに再懸濁する。凍結融解およびソニケーションにより菌体を破砕し、遠心（8000×g、10分、4℃）して固形夾雑物を取り除く。目的の発現タンパク質が上清に存在することをSDS-PAGEで確認した後、誘導発現されたHisタグ融合タンパク質をニッケルキレートカラムを用いて精製する。

【0 2 7 6】

（比較例 2 5：対照としてのppuMDHおよびgoxDpの調製）

Pseudomonas putida [ATCC 47054]から常法に従いゲノムDNAを調製する。このゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、約1 2 9 0 b pのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCATatgtcagacctgaaaaccgcccgtctcgaatat-3' (NdeI) [配列番号 8 0]

5'-aataatCTCGAGgccgttgaacacttcatccacgctggctcag-3' (XhoI) [配列番号 8 1]

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pET-21a(+) (Novagen社製)の同じ制限酵素サイトに挿入し、ppuMDH-His発現ベクターpET21-ppuMDHを作製する。

【0 2 7 7】

次にGluconobacter oxydans [ATCC 621H]から常法に従いゲノムDNAを調製する。このゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、約1 4 2 0 b pのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCATATGtgcatatcgatctgattgttgggt-3' (NdeI) [配列番号 4 9]

5'-aataatCTCGAGgatatgcagcgggcccgtcgaaggccgcccag-3' (XhoI) [配列番号 6 0]

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pET-21a(+) (Novagen社製)の同じ制限酵素サイトに挿入し、goxDp-His発現ベクターpET21-goxDpを作製する。

【0 2 7 8】

発現ベクターpET21-ppuMDHおよびpET21-goxDpをそれぞれ個別に用い、E.coli BL21(DE3)を常法に従い形質転換する。形質転換体は抗生物質アンピシリンに対する耐性株として選別することができる。

【0 2 7 9】

得られたそれぞれの形質転換体を抗生物質アンピシリンを添加したLB培地10mLで一晩プレ・カルチャーした後、その0.2mLを、100mLのLB-Amp培地に添加し、30、170rpmで4時間振とう培養する。その後IPTGを添加（終濃度 1mM）し、37℃で4 12時間培養を続ける。IPTG誘導した形質転換体を集菌（8000×g、2分、4℃）し、1/10量の4℃PBSに再懸濁する。凍結融解およびソニケーションにより菌体を破砕し、遠心（8000×g、10分、4℃）して固形夾雑物を取り除く。目的の発現タンパク質が上清に存在することをSDS-PAGEで確認した後、それぞれの誘導発現されたHisタグ融合タンパク質をニッケルキレートカラムを用いて精製する。

（実施例 2 6：リンゴ酸センサー）

図 2 8 および図 8 を用いて実施例 2 6 を説明する。実施例 2 6 にかかるセンサーは試料

溶液中のリンゴ酸を定量するリンゴ酸センサーである。実施例 26 に係るリンゴ酸センサーの酵素電極部を図 28 を用いて説明する。

【0280】

酵素電極部は以下の構成からなる。導電性基体 20 は直径 3 mm のグラッシーカーボンである。導電性基体 20 上に実施例 25 で調製した融合タンパク質 (His-ppuMDH::goxDp)、及びフェロセン結合ポリアリルアミン (Fc - PAA) が PEGDE により架橋されて固定されている。各成分は、各成分は、それぞれ以下の最適の濃度により固定されている。すなわち His-ppuMDH::goxDp (ppuMDH : 0 . 3 ユニット、goxDp : 0 . 6 ユニット)、Fc-PAA : 16 μ g、PEGDE : 10 μ g で調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で 2 時間以上放置、乾燥させることにより行う。

10

【0281】

この酵素電極部を、図 8 における作用電極 4 として用いることによってリンゴ酸センサーを構成する。対極 5 は白金線、参照極 6 は銀 / 塩化銀電極で構成する。これらの電極は、それぞれポテンショスタット 10 を介して電流などを測定する。試料溶液 3 としては、所定濃度のリンゴ酸、および 1 mM NAD を含む 0 . 1 M PIPES - NaOH 緩衝水溶液 (pH 7 . 5) を用いる。測定温度は、恒温循環槽によって 30 に保持される。

【0282】

前述のリンゴ酸センサーを用いて次のように定量を行う。作用電極 4 には参照極 6 に対して 300 mV の電位を印加する。このとき、試料溶液 3 中のリンゴ酸はリンゴ酸デヒドロゲナーゼの存在下でピルビン酸に酸化され、この反応で NAD が NADH に還元される。次に前記リンゴ酸デヒドロゲナーゼに融合したジアフォラーゼの存在下で NADH は NAD に酸化され、この反応で電子伝達メディエータであるフェロセンが酸化され、フェリシニウムイオンが生成される。(作用電極 4 には参照極 6 に対して 300 mV の電位が印加されているため、) フェリシニウムイオンは作用電極 4 から電子をうけとりフェロセンに還元される。作用電極 4 での電子の移動による電流を測定することにより、試料溶液中のリンゴ酸濃度を測定する。

20

【0283】

(比較例 26 : リンゴ酸センサー)

図 30 および図 8 を用いて比較例 26 を説明する。比較例 26 にかかるセンサーは試料溶液中のリンゴ酸を定量するリンゴ酸センサーである。比較例 26 に係るリンゴ酸センサーの酵素電極部を図 30 を用いて説明する。

30

【0284】

酵素電極部は以下の構成からなる。導電性基体 20 は直径 3 mm のグラッシーカーボンである。導電性基体 20 上にリンゴ酸デヒドロゲナーゼ (ppuMDH)、ジアフォラーゼ (goxDp)、及びフェロセン結合ポリアリルアミン (Fc - PAA) が PEGDE により架橋されて固定されている。リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (ppuMDH) は、比較例 25 で調製した *Pseudomonas putida* 由来のリンゴ酸デヒドロゲナーゼである。ジアフォラーゼ (goxDp) は、*Glucobacter oxydans* 由来のジアフォラーゼである。各成分は、各成分は、それぞれ以下の最適の濃度により固定されている。すなわち ppuMDH : 0 . 3 ユニット、goxDp : 0 . 6 ユニット、Fc-PAA : 16 μ g、PEGDE : 10 μ g で調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で 2 時間以上放置、乾燥させることにより行う。

40

【0285】

この酵素電極部を用いて、実施例 26 と同様にして、試料溶液中のリンゴ酸濃度を測定する。

【0286】

実施例 26 と比較例 26 における結果の相違は、図 11 の A と B の相違に類似した傾向を示す。

【0287】

実施例 26 と比較例 26 から、実施例 26 のリンゴ酸センサーの方が、比較例 26 のリンゴ酸センサーよりも、リンゴ酸濃度に対する感度が高く、より低濃度のリンゴ酸を定量

50

出来ることが明らかとなった。酵素電極上に固定されているリンゴ酸デヒドロゲナーゼ及びジアフォラーゼの量は同じであるにもかかわらず、実施例 26 の酵素電極においては、リンゴ酸デヒドロゲナーゼとジアフォラーゼが融合しているために、両酵素が物理的近傍に保持されている。このため、NAD / NADH を介した両酵素間の電子授受が速やかに行われるためと考えられた。

(実施例 27 : リンゴ酸燃料電池)

図 28 及び図 9 を用いて実施例 27 を説明する。実施例 27 にかかる燃料電池はリンゴ酸を燃料とするリンゴ酸燃料電池である。実施例 27 に係るリンゴ酸燃料電池のアノード電極部を図 28 を用いて説明する。

【0288】

アノード電極部は以下の構成からなる。導電性基体 20 は 0.5 cm^2 のグラッシーカーボンである。導電性基体 20 上に実施例 25 で調製した融合タンパク質 (His-ppuMDH::goxDp)、及びフェロセン結合ポリアリルアミン (Fc-PAA) が PEGDE により架橋されて固定されている。各成分は、各成分は、それぞれ以下の最適の濃度比により導電性基体 20 上に固定されている。すなわち、His-ppuMDH::goxDp (ppuMDH : 0.3 ユニット、goxDp : 0.6 ユニット)、Fc-PAA : $16 \mu\text{g}$ 、PEGDE : $10 \mu\text{g}$ で調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で 2 時間以上放置、乾燥させることにより行う。

【0289】

実施例 27 に係るリンゴ酸燃料電池のカソード電極 16 は 0.5 cm^2 の白金板からなる。電解質溶液 3 は、 100 mM 塩化ナトリウム、 5 mM リンゴ酸、および 1 mM ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) である。アノード電極 15 とカソード電極 16 は、間に多孔質ポリプロピレンフィルム (厚さ $20 \mu\text{m}$) 17 を挟んで配置され、これを蓋 2 付のウォータージャケットセル 1 中の前記電解液溶液 3 中 (10 mL) に配置する。測定温度は、恒温循環槽によって 30°C に保持される。それぞれのリードをポテンショスタット (東方技研、モデル 2000) 10 に接続し、 -1.2 V から 0.1 V まで電圧を変化させ、電圧 - 電流特性を測定した。

短絡電流密度 : $1025 \mu\text{A} / \text{cm}^2$

最大電力 : $98 \mu\text{W} / \text{cm}^2$

の電池出力が観測される。

(比較例 27 : リンゴ酸燃料電池)

図 30 及び図 9 を用いて比較例 27 を説明する。比較例 27 にかかる燃料電池はリンゴ酸を燃料とするリンゴ酸燃料電池である。比較例 27 に係るリンゴ酸燃料電池のアノード電極部を図 30 を用いて説明する。

【0290】

アノード電極部は以下の構成からなる。導電性基体 20 は 0.5 cm^2 のグラッシーカーボンである。導電性基体 20 上にリンゴ酸デヒドロゲナーゼ (ppuMDH)、ジアフォラーゼ (goxDp)、及びフェロセン結合ポリアリルアミン (Fc-PAA) が PEGDE により架橋されて固定されている。リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (ppuMDH) は、比較例 25 で調製した *Pseudomonas putida* 由来のリンゴ酸デヒドロゲナーゼである。ジアフォラーゼ (goxDp) は、*Glucanobacter oxydans* 由来のジアフォラーゼである。各成分は、各成分は、それぞれ以下の最適の濃度により導電性基体 20 上に固定されている。すなわち、ppuMDH : 0.3 ユニット、goxDp : 0.6 ユニット、Fc-PAA : $16 \mu\text{g}$ 、PEGDE : $10 \mu\text{g}$ で調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で 2 時間以上放置、乾燥させることにより行う。

【0291】

比較例 27 に係るリンゴ酸燃料電池を用いて、実施例 27 と同様に電圧 - 電流特性を測定した。

短絡電流密度 : $297 \mu\text{A} / \text{cm}^2$

最大電力 : $30 \mu\text{W} / \text{cm}^2$

10

20

30

40

50

の電池出力が観測される。

【0292】

実施例27と比較例27から、実施例27のリンゴ酸燃料電池の方が、比較例27のリンゴ酸燃料電池よりも、電流密度が高く、より大きな電流を取り出せることが明らかとなった。酵素電極上に固定されているリンゴ酸デヒドロゲナーゼ及びジアフォラーゼの量は同じであるにもかかわらず、実施例27の燃料電池においては、リンゴ酸デヒドロゲナーゼとジアフォラーゼが融合しているために、両酵素が物理的近傍に保持されている。このため、NAD/NADHを介した両酵素間の電子授受が速やかに行われるためと考えられた。

【0293】

(実施例28：リンゴ酸電気化学反応装置)

図28および図8を用いて実施例28を説明する。実施例28にかかる電気化学反応装置はリンゴ酸を基質としてピルビン酸を生産するリンゴ酸電気化学反応装置である。実施例28に係るリンゴ酸電気化学反応装置の酵素電極部を図28を用いて説明する。

【0294】

酵素電極部は以下の構成からなる。導電性基体20は0.5 cm²のグラッシーカーボンである。導電性基体20上に実施例25で調製した融合タンパク質(His-ppuMDH::goxDp)、及びフェロセン結合ポリアリルアミン(Fc-PAA)がPEGDEにより架橋されて固定されている。各成分は、各成分は、それぞれ以下の最適の濃度により固定されている。すなわちHis-ppuMDH::goxDp(ppuMDH: 0.3ユニット、goxDp: 0.6ユニット)、Fc-PAA: 16 μg、PEGDE: 10 μgで調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で2時間以上放置、乾燥させることにより行う。

【0295】

この酵素電極を図8における作用電極4として用いることによってリンゴ酸電気化学反応装置を構成する。銀塩化銀電極を参照電極6に、白金線を対極5とした三極セルを構成する。100 mM塩化ナトリウム、5 mMリンゴ酸、および1 mMニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを含む50 mMリン酸緩衝液(pH 7.5)電解液を試料溶液3として使用し、恒温循環槽によって30℃に保持される。ウォータージャケットセル1中室素雰囲気下0.3 V vs Ag/AgClの電位を100分間印加し、生成物を高速液体クロマトグラフィーで定量する。

【0296】

反応電解液からは、ピルビン酸が検出され、反応電荷量と、生成ピルビン酸量には、高い相関関係があり、反応が定量的に進行することがわかる。

(比較例28：リンゴ酸電気化学反応装置)

図30および図8を用いて比較例28を説明する。比較例28にかかる電気化学反応装置はリンゴ酸を基質としてピルビン酸を生産するリンゴ酸電気化学反応装置である。比較例28にかかるリンゴ酸電気化学反応装置の酵素電極部を図30を用いて説明する。

【0297】

酵素電極部は以下の構成からなる。導電性基体20は0.5 cm²のグラッシーカーボンである。導電性基体20上にリンゴ酸デヒドロゲナーゼ(ppuMDH)、ジアフォラーゼ(goxDp)、及びフェロセン結合ポリアリルアミン(Fc-PAA)がPEGDEにより架橋されて固定されている。リンゴ酸デヒドロゲナーゼ(ppuMDH)は、比較例25で調製したPseudomonas putida由来のリンゴ酸デヒドロゲナーゼである。ジアフォラーゼ(goxDp)はGlucobacter oxydans由来のジアフォラーゼである。各成分は、各成分は、それぞれ以下の最適の濃度により固定されている。すなわちppuMDH: 0.3ユニット、goxDp: 0.6ユニット、Fc-PAA: 16 μg、PEGDE: 10 μgで調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で2時間以上放置、乾燥させることにより行う。

【0298】

この酵素電極を用いて、実施例28と同様に、生成物を高速液体クロマトグラフィーで定量する。

【0299】

10

20

30

40

50

反応電解液からは、ピルビン酸が検出され、反応電荷量と、生成ピルビン酸量には、高い相関関係があり、反応が定量的に進行することがわかる。しかしながら実施例 28 の場合よりも単位時間あたりの反応電荷量は小さい値であることがわかる。

実施例 28 と比較例 28 から、実施例 28 のリンゴ酸電気化学反応装置の方が、比較例 28 のリンゴ酸電気化学反応装置よりも、単位時間あたりの反応電荷量が高く、より効率的にリンゴ酸をピルビン酸に変換出来ることが明らかとなる。酵素電極上に固定されているリンゴ酸デヒドロゲナーゼ及びジアフォラーゼの量は同じであるにもかかわらず、実施例 28 の電気化学反応装置においては、リンゴ酸デヒドロゲナーゼとジアフォラーゼが融合しているために、両酵素が物理的の近傍に保持されている。このため、NAD/NADH を介した両酵素間の電子授受が速やかに行われるためと考えられた。

10

(実施例 29 : *Pyrococcus furiosus* 由来のリンゴ酸デヒドロゲナーゼ (pfuMDH) と *Thermotoga maritima* 由来のジアフォラーゼ (tmaDp) との融合タンパク質 (His-pfuMDH::tmaDp) [配列番号 87、88] の調製)

Pyrococcus furiosus [ATCC 43587] から常法に従いゲノム DNA を調製する。このゲノム DNA を鋳型にして、以下の合成オリゴ DNA をプライマーとして用いて PCR を行い、1327 bp の DNA 増幅産物を得る。

5'-aataatGGATCCGgctaggatcactgaggaacaaagaaggaaa-3' (BamHI) [配列番号 82]

5'-aataatAAGCTTtagtaatgtactgtttccttctttcatttaa-3' (HindIII) [配列番号 83]

この DNA 増幅産物を制限酵素 BamHI および Hind III で切断し、pETDuet-1 (Novagen 社製) の同じ制限酵素サイトに挿入し、His-pfuMDH 発現ベクター pETDuet-pfuMDH を作製する。

20

【0300】

次に *Thermotoga maritima* [ATCC 43589] から常法に従いゲノム DNA を調製する。このゲノム DNA を鋳型にして、以下の合成オリゴ DNA をプライマーとして用いて PCR を行い、1371 bp の DNA 増幅産物を得る。

5'-aataatCATATGtacgatgctgtgatcataggaggaggaccc-3' (NdeI) [配列番号 63]

5'-aataatCTCGAGtcacagatgaatgggtttcctgagacccc-3' (XhoI) [配列番号 64]

この DNA 増幅産物を制限酵素 Nde I および Xho I で切断し、pETDuet-pfuMDH の同じ制限酵素サイトに挿入し、His-pfuMDH、tmaDp 共発現ベクター pETDuet-pfuMDH-tmaDp を作製する。

30

【0301】

次に、以下の 5' 末端リン酸化合物合成オリゴ DNA を TE バッファー中で、等量混合し、加熱後徐冷することによってアニーリングする。

5'-AGCTTgaaggcaaaagcagcggcagcggcagcgaagcaaaagcaccCA-3' [配列番号 51]

5'-TATGggtgcttttgctttcgctgccgctgccgctgctttgccttcA-3' [配列番号 52]

この DNA 断片を、pETDuet-pfuMDH-tmaDp の制限酵素 Hind III および Nde I の認識サイトに挿入し、His-pfuMDH と tmaDp がスパーサー配列 EGKSSGSGSESKST によって連結された融合タンパク質 His-pfuMDH::tmaDp 発現ベクター pETDuet-pfuMDH::tmaDp [配列番号 84] を作製する。

【0302】

40

次に *Pyrococcus furiosus* [ATCC 43587] のゲノム DNA 鋳型にして、以下の合成オリゴ DNA をプライマーとして用いて PCR を行い、1325 bp の DNA 増幅産物を得る。

5'-aataatCCATGGcgaggatcactgaggaacaaagaaggaaactt-3' (NcoI) [配列番号 85]

5'-aataatAAGCTTtagtaatgtactgtttccttctttcatttaa-3' (HindIII) [配列番号 83]

この DNA 増幅産物を制限酵素 Nco I および Hind III で切断し、pCDFDuet-1 (Novagen 社製) の同じ制限酵素サイトに挿入し、pfuMDH 発現ベクター pCDFDuet-pfuMDH を作製する。

【0303】

次に *Thermotoga maritima* [ATCC 43589] のゲノム DNA を鋳型にして、以下の合成オリゴ DNA をプライマーとして用いて PCR を行い、1371 bp の DNA 増幅産物を得る。

5'-aataatCATATGtacgatgctgtgatcataggaggaggaccc-3' (NdeI) [配列番号 63]

50

5'-aataatCTCGAGTcacagatgaatgggttttctgagacccc-3' (XhoI) [配列番号 64]

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pCDFDuet-pfuMDHの同じ制限酵素サイトに挿入し、pfuMDH、tmaDp共発現ベクターpCDFDuet-pfuMDH-tmaDp [配列番号 86]を作製する。

【0304】

発現ベクターpETDuet-pfuMDH::tmaDpおよびpCDFDuet-pfuMDH-tmaDpを用い常法に従いE. coli BL21(DE3)を形質転換する。形質転換体は抗生物質アンピシリンおよびストレプトマイシンに対する耐性株として選別することができる。

【0305】

得られた形質転換体を抗生物質アンピシリン及びストレプトマイシンを添加したLB培地 10mLで一晩プレ・カルチャーした後、その0.2mLを、100mLのLB-Amp培地に添加し、37、170rpmで4時間振とう培養する。その後IPTGを添加（終濃度 1mM）し、37 で4 12時間培養を続ける。IPTG 誘導した形質転換体を集菌（8000×g、2分、4 ）し、1/10 量の 4 PBSに再懸濁する。凍結融解およびソニケーションにより菌体を破砕し、遠心（8000×g、10分、4 ）して固形夾雑物を取り除く。目的の発現タンパク質が上清に存在することをSDS-PAGEで確認した後、誘導発現されたHisタグ融合タンパク質をニッケルキレートカラムを用いて精製する。

【0306】

こうして得られる好熱菌由来の融合タンパク質を用いて、リンゴ酸センサーや燃料電池等を構成できる。

（実施例 33：Burkholderia mallei由来のグルタミン酸デヒドロゲナーゼ（bmaEDH）とGluconobacter oxydans由来のジアフォラーゼ（goxDp）との融合タンパク質（His-bmaEDH::goxDp）[配列番号 96、97]の調製）

Burkholderia mallei [ATCC 23344]から常法に従いゲノムDNAを調製する。このゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、1324bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatGGATCCGtcttcgcaatcgagcgtccccgtccgtcgcg-3' (BamHI) [配列番号 91]

5'-aataatAAGCTTggggtacagaccgcgcatcttcgcgccat-3' (HindIII) [配列番号 92]

このDNA増幅産物を制限酵素BamHIおよびHind IIIで切断し、pETDuet-1(Novagen社製)の同じ制限酵素サイトに挿入し、His-bmaEDH発現ベクターpETDuet-bmaEDHを作製する。

【0307】

次にGluconobacter oxydans [ATCC 621H]から常法に従いゲノムDNAを調製する。このゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、1428bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCATATGtgcgatacgttcgatctgattgttgggt-3' (NdeI) [配列番号 49]

5'-aataatCTCGAGTcagatatgcagcgggcccgtcgaaggccgc-3' (XhoI) [配列番号 50]

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pETDuet-bmaEDHの同じ制限酵素サイトに挿入し、His-bmaEDH、goxDp共発現ベクターpETDuet-bmaEDH-goxDpを作製する。

【0308】

次に以下の5'末端リン酸化合成オリゴDNAをTEバッファー中で、等量混合し、加熱後徐冷することによってアニーリングする。

5'-AGCTTgaaggcaaaagcagcggcagcggcagcgaagcaaaagcaccCA-3' [配列番号 51]

5'-TATGggtgcttttgcgttcgctgccgctgccgctgcttttgccttcA-3' [配列番号 52]

このDNA断片を、pETDuet-bmaEDH-goxDpの制限酵素Hind IIIおよびNde Iの認識サイトに挿入し、His-bmaEDHとgoxDpがスパーサー配列EGKSSGSGSESKSTによって連結された融合タンパク質His-bmaEDH::goxDp発現ベクターpETDuet-bmaEDH::goxDp [配列番号 93]を作製

する。

【0309】

次にBurkholderia mallei [ATCC 23344]のゲノムDNA鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、1322bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCCATGGcgtcgcgaatcgcagtcctccgcgtcgcgcag-3' (Nco I) [配列番号94]

5'-aataatAAGCTTgggtacagaccgcgcatttcgcgcgccat-3' (HindIII) [配列番号92]

このDNA増幅産物を制限酵素Nco IおよびHind IIIで切断し、pCDFDuet-1 (Novagen社製)の同じ制限酵素サイトに挿入し、bmaEDH発現ベクター-pCDFDuet-bmaEDHを作製する。

【0310】

次にGluconobacter oxydans [ATCC 621H]のゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、1428bpのDNA増幅産物を得る。 10

5'-aataatCATATGtgcgatacgttcgatctgattgttgttgg-3' (NdeI) [配列番号49]

5'-aataatCTCGAGtcagatatgcagcgggccgtcgaaggccgc-3' (XhoI) [配列番号50]

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pCDFDuet-bmaEDHの同じ制限酵素サイトに挿入し、bmaEDH、goxDp共発現ベクター-pCDFDuet-bmaEDH-goxDp [配列番号95]を作製する。

【0311】

発現ベクター-pETDuet-bmaEDH::goxDpおよびpCDFDuet-bmaEDH-goxDpを用い、常法に従いE. coli BL21(DE3)を形質転換する。形質転換体は抗生物質アンピシリンおよびストレプトマイシンに対する耐性株として選別することができる。 20

【0312】

得られた形質転換体を抗生物質アンピシリン及びストレプトマイシンを添加したLB培地10mLで一晩プレ・カルチャーした後、その0.2mLを、100mLのLB-Amp培地に添加し、30、170rpmで4時間振とう培養する。その後IPTGを添加(終濃度1mM)し、37℃で412時間培養を続ける。IPTG誘導した形質転換体を集菌(8000×g、2分、4℃)し、1/10量の4×PBSに再懸濁する。凍結融解およびソニケーションにより菌体を破砕し、遠心(8000×g、10分、4℃)して固形夾雑物を取り除く。目的の発現タンパク質が上清に存在することをSDS-PAGEで確認した後、誘導発現されたHisタグ融合タンパク質をニッケルキレートカラムを用いて精製する。

【0313】

(比較例33:対照としてのbmaEDHおよびgoxDpの調製)

Burkholderia mallei [ATCC 23344]から常法に従いゲノムDNAを調製する。このゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、約1320bpのDNA増幅産物を得る。 30

5'-aataatCATatgtcttcgcaatcgcagtcctccgcgtcgcg-3' (NdeI) [配列番号98]

5'-aataatCTCGAGgggtacagaccgcgcatttcgcgcgccat-3' (XhoI) [配列番号99]

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pET-21a(+) (Novagen社製)の同じ制限酵素サイトに挿入し、bmaEDH-His発現ベクター-pET21-bmaEDHを作製する。

【0314】

次にGluconobacter oxydans [ATCC 621H]から常法に従いゲノムDNAを調製する。このゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、約1420bpのDNA増幅産物を得る。 40

5'-aataatCATATGtgcgatacgttcgatctgattgttgttgg-3' (NdeI) [配列番号49]

5'-aataatCTCGAGgatatgcagcgggccgtcgaaggccgccag-3' (XhoI) [配列番号60]

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pET-21a(+) (Novagen社製)の同じ制限酵素サイトに挿入し、goxDp-His発現ベクター-pET21-goxDpを作製する。

【0315】

発現ベクター-pET21-bmaEDHおよびpET21-goxDpをそれぞれ個別に、E. coli BL21(DE3)を常法に従い形質転換する。形質転換体は抗生物質アンピシリンに対する耐性株として選別することができる。 50

【0316】

得られたそれぞれの形質転換体を抗生物質アンピシリンを添加したLB培地10mLで一晩ブレ・カルチャーした後、その0.2mLを、100mLのLB-Amp培地に添加し、30、170rpmで4時間振とう培養する。その後IPTGを添加（終濃度1mM）し、37で412時間培養を続ける。IPTG誘導した形質転換体を集菌（8000×g、2分、4）し、1/10量の4PBSに再懸濁する。凍結融解およびソニケーションにより菌体を破砕し、遠心（8000×g、10分、4）して固形夾雑物を取り除く。目的の発現タンパク質が上清に存在することをSDS-PAGEで確認した後、それぞれの誘導発現されたHisタグ融合タンパク質をニッケルキレートカラムを用いて精製する。

【0317】

（実施例34：グルタミン酸センサー）

図34および図8を用いて実施例34を説明する。実施例34にかかるセンサーは試料溶液中のグルタミン酸を定量するグルタミン酸センサーである。実施例34に係るグルタミン酸センサーの酵素電極部を図34を用いて説明する。

【0318】

酵素電極部は以下の構成からなる。導電性基体20は直径3mmのグラッシーカーボンである。導電性基体20上に実施例33で調製した融合タンパク質（His-bmaEDH::goxDp）、及びフェロセン結合ポリアリルアミン（Fc-PAA）がPEGDEにより架橋されて固定されている。各成分は、それぞれ以下の最適の濃度により固定されている。すなわちHis-bmaEDH::goxDp（bmaEDH：0.3ユニット、goxDp：0.6ユニット）、Fc-PAA：16μg、PEGDE：10μgで調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で2時間以上放置、乾燥させることにより行う。

【0319】

この酵素電極部を、図8における作用電極4として用いることによってグルタミン酸センサーを構成する。対極5は白金線、参照極6は銀/塩化銀電極で構成する。これらの電極は、それぞれポテンシostat10を介して電流などを測定する。試料溶液3としては、所定濃度のグルタミン酸、および1mM NADを含む0.1M PIPES-NaOH緩衝水溶液（pH7.5）を用いる。測定温度は、恒温循環槽によって30に保持される。

【0320】

前述のグルタミン酸センサーを用いて次のように定量を行う。作用電極4には参照極6に対して300mVの電位を印加する。このとき、試料溶液3中のグルタミン酸はグルタミン酸デヒドロゲナーゼの存在下で2-オキソグルタル酸に酸化され、この反応でNADがNADHに還元される。次に前記グルタミン酸デヒドロゲナーゼに融合したジアフォラーゼの存在下でNADHはNADに酸化され、この反応で電子伝達メディエータであるフェロセンが酸化され、フェリシニウムイオンが生成される。（作用電極4には参照極6に対して300mVの電位が印加されているため、）フェリシニウムイオンは作用電極4から電子を受けとりフェロセンに還元される。作用電極4での電子の移動による電流を測定することにより、試料溶液中のグルタミン酸濃度を測定する。

【0321】

（比較例34：グルタミン酸センサー）

図36および図8を用いて比較例34を説明する。比較例34にかかるセンサーは試料溶液中のグルタミン酸を定量するグルタミン酸センサーである。比較例34に係るグルタミン酸センサーの酵素電極部を図36を用いて説明する。

【0322】

酵素電極部は以下の構成からなる。導電性基体20は直径3mmのグラッシーカーボンである。導電性基体20上にグルタミン酸デヒドロゲナーゼ（bmaEDH）、ジアフォラーゼ（goxDp）、及びフェロセン結合ポリアリルアミン（Fc-PAA）がPEGDEにより架橋されて固定されている。グルタミン酸デヒドロゲナーゼ（bmaEDH）は、比較例33で調製したBurkholderia mallei由来のグルタミン酸デヒドロゲナーゼである。ジアフォラーゼ（goxDp）は、Gluconobacter oxydans由来のジアフォラーゼである。各成分は、それぞれ以下の

10

20

30

40

50

最適の濃度により固定されている。すなわちbmaEDH：0.3ユニット、goxDp：0.6ユニット、Fc-PAA：16 μ g、PEGDE：10 μ gで調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で2時間以上放置、乾燥させることにより行う。

【0323】

この酵素電極部を用いて、実施例34と同様に、試料溶液中のグルタミン酸濃度を測定する。実施例34と比較例34との相違は、図11のAとBとの相違に類似する。

【0324】

実施例34と比較例34から、実施例34のグルタミン酸センサーの方が、比較例34のグルタミン酸センサーよりも、グルタミン酸濃度に対する感度が高く、より低濃度のグルタミン酸を定量出来ることが明らかとなった。酵素電極上に固定されているグルタミン酸デヒドロゲナーゼ及びジアフォラーゼの量は同じであるにもかかわらず、実施例34の酵素電極においては、グルタミン酸デヒドロゲナーゼとジアフォラーゼが融合しているために、両酵素が物理的の近傍に保持されている。このため、NAD/NADHを介した両酵素間の電子授受が速やかに行われるためと考えられた。

【0325】

(実施例35：グルタミン酸燃料電池)

図34及び図9を用いて実施例35を説明する。実施例35にかかる燃料電池はグルタミン酸を燃料とするグルタミン酸燃料電池である。実施例35に係るグルタミン酸燃料電池のアノード電極部を図34を用いて説明する。

【0326】

アノード電極部は以下の構成からなる。導電性基体20は0.5 cm^2 のグラッシーカーボンである。導電性基体20上に実施例33で調製した融合タンパク質(His-bmaEDH:goxDp)、及びフェロセン結合ポリアリルアミン(Fc-PAA)がPEGDEにより架橋されて固定されている。各成分は、それぞれ以下の最適の濃度比により導電性基体20上に固定されている。すなわち、His-bmaEDH:goxDp(bmaEDH:0.3ユニット、goxDp:0.6ユニット)、Fc-PAA:16 μ g、PEGDE:10 μ gで調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で2時間以上放置、乾燥させることにより行う。

【0327】

実施例35に係るグルタミン酸燃料電池のカソード電極16は0.5 cm^2 の白金板からなる。電解質溶液3は、100 mM塩化ナトリウム、5 mMグルタミン酸、および1 mMニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを含む50 mMリン酸緩衝液(pH7.5)である。前記アノード電極15とカソード電極16は、間に多孔質ポリプロピレンフィルム(厚さ20 μ m)17を挟んで配置され、これを蓋2付のウォータージャケットセル1中の前記電解液溶液3中(10 mL)に配置する。測定温度は、恒温循環槽によって30に保持される。それぞれのリードをポテンショスタット(東方技研、モデル2000)10に接続し、-1.2 Vから0.1 Vまで電圧を変化させ、電圧-電流特性を測定した。

短絡電流密度：1225 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$

最大電力：105 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$

の電池出力が観測される。

【0328】

(比較例35：グルタミン酸燃料電池)

図36及び図9を用いて比較例35を説明する。比較例35にかかる燃料電池はグルタミン酸を燃料とするグルタミン酸燃料電池である。比較例35に係るグルタミン酸燃料電池のアノード電極部を図36を用いて説明する。

【0329】

アノード電極部は以下の構成からなる。導電性基体20は0.5 cm^2 のグラッシーカーボンである。導電性基体20上にグルタミン酸デヒドロゲナーゼ(bmaEDH)、ジアフォラーゼ(goxDp)、及びフェロセン結合ポリアリルアミン(Fc-PAA)がPEGDEにより架橋

されて固定されている。グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (bmaEDH) は、比較例 33 で調製した *Burkholderia mallei* 由来のグルタミン酸デヒドロゲナーゼである。ジアフォラーゼ (goxDp) は、*Gluconobacter oxydans* 由来のジアフォラーゼである。各成分は、それぞれ以下の最適の濃度により導電性基体 20 上に固定されている。すなわち、bmaEDH: 0.3 ユニット、goxDp: 0.6 ユニット、Fc-PAA: 16 μg 、PEGDE: 10 μg で調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で 2 時間以上放置、乾燥させることにより行う。

【0330】

比較例 35 に係るグルタミン酸燃料電池を用いて実施例 35 と同様に、電圧 - 電流特性を測定した。

短絡電流密度: 386 $\mu\text{A} / \text{cm}^2$

最大電力: 33 $\mu\text{W} / \text{cm}^2$

の電池出力が観測される。

【0331】

実施例 35 と比較例 35 から、実施例 35 のグルタミン酸燃料電池の方が、比較例 35 のグルタミン酸燃料電池よりも、電流密度が高く、より大きな電流を取り出せることが明らかとなった。酵素電極上に固定されているグルタミン酸デヒドロゲナーゼ及びジアフォラーゼの量は同じであるにもかかわらず、実施例 35 の燃料電池においては、グルタミン酸デヒドロゲナーゼとジアフォラーゼが融合しているために、両酵素が物理的近傍に保持されている。このため、NAD / NADH を介した両酵素間の電子授受が速やかに行われるためと考えられた。

【0332】

(実施例 36 : グルタミン酸電気化学反応装置)

図 34 および図 8 を用いて実施例 36 を説明する。実施例 36 にかかる電気化学反応装置はグルタミン酸を基質として 2 - オキソグルタル酸を生産するグルタミン酸電気化学反応装置である。実施例 36 に係るグルタミン酸電気化学反応装置の酵素電極部を図 34 を用いて説明する。

【0333】

酵素電極部は以下の構成からなる。導電性基体 20 は 0.5 cm^2 のグラッシーカーボンである。導電性基体 20 上に実施例 33 で調製した融合タンパク質 (His-bmaEDH::goxDp)、及びフェロセン結合ポリアリルアミン (Fc-PAA) が PEGDE により架橋されて固定されている。各成分は、それぞれ以下の最適の濃度により固定されている。すなわち His-bmaEDH::goxDp (bmaEDH: 0.3 ユニット、goxDp: 0.6 ユニット)、Fc-PAA: 16 μg 、PEGDE: 10 μg で調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で 2 時間以上放置、乾燥させることにより行う。

【0334】

この酵素電極を図 8 における作用電極 4 として用いることによってグルタミン酸電気化学反応装置を構成する。銀塩化銀電極を参照電極 6 に、白金線を対極 5 とした三極セルを構成する。100 mM 塩化ナトリウム、5 mM グルタミン酸、および 1 mM ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) 電解液を試料溶液 3 として使用し、恒温循環槽によって 30 に保持される。ウォータージャケットセル 1 中窒素雰囲気下 0.3 V vs Ag / AgCl の電位を 100 分間印加し、生成物を高速液体クロマトグラフィーで定量する。

【0335】

反応電解液からは、2 - オキソグルタル酸が検出され、反応電荷量と、生成 2 - オキソグルタル酸量には、高い相関関係があり、反応が定量的に進行することがわかる。

【0336】

(比較例 36 : グルタミン酸電気化学反応装置)

図 36 および図 8 を用いて比較例 36 を説明する。比較例 36 にかかる電気化学反応装置はグルタミン酸を基質として 2 - オキソグルタル酸を生産するグルタミン酸電気化学反

10

20

30

40

50

応装置である。比較例 3 6 にかかるグルタミン酸電気化学反応装置の酵素電極部を図 3 6 を用いて説明する。

【0337】

酵素電極部は以下の構成からなる。導電性基体 2 0 は 0.5 cm^2 のグラッシーカーボンである。導電性基体 2 0 上にグルタミン酸デヒドロゲナーゼ (bmaEDH)、ジアフォラーゼ (goxDp)、及びフェロセン結合ポリアリルアミン (Fc-PAA) が PEGDE により架橋されて固定されている。グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (bmaEDH) は、比較例 3 3 で調製した *Burkholderia mallei* 由来のグルタミン酸デヒドロゲナーゼである。ジアフォラーゼ (goxDp) は、*Gluconobacter oxydans* 由来のジアフォラーゼである。各成分は、それぞれ以下の最適の濃度により固定されている。すなわち bmaEDH: 0.3 ユニット、goxDp: 0.6 ユニット、Fc-PAA: $16 \mu\text{g}$ 、PEGDE: $10 \mu\text{g}$ で調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で 2 時間以上放置、乾燥させることにより行う。

10

【0338】

この酵素電極を用いて実施例 3 6 と同様に、生成物を高速液体クロマトグラフィーで定量する。

【0339】

反応電解液からは、2 - オキソグルタル酸が検出され、反応電荷量と、生成 2 - オキソグルタル酸量には、高い相関関係があり、反応が定量的に進行することがわかる。しかしながら実施例 3 6 の場合よりも単位時間あたりの反応電荷量は小さい値であることがわかる。

20

【0340】

実施例 3 6 と比較例 3 6 から、実施例 3 6 のグルタミン酸電気化学反応装置の方が、比較例 3 6 のグルタミン酸電気化学反応装置よりも、単位時間あたりの反応電荷量が高く、より効率的にグルタミン酸を 2 - オキソグルタル酸に変換出来ることが明らかとなる。酵素電極上に固定されているグルタミン酸デヒドロゲナーゼ及びジアフォラーゼの量は同じであるにもかかわらず、実施例 3 6 の電気化学反応装置においては、グルタミン酸デヒドロゲナーゼとジアフォラーゼが融合しているために、両酵素が物理的的近傍に保持されている。このため、NAD/NADH を介した両酵素間の電子授受が速やかに行われるためと考えられた。

30

【0341】

(実施例 3 7 : *Pyrococcus furiosus* 由来のグルタミン酸デヒドロゲナーゼ (pfuEDH) と *Thermotoga maritima* 由来のジアフォラーゼ (tmaDp) との融合タンパク質 (His-pfuEDH::tmaDp) [配列番号 1 0 5、1 0 6] の調製)

Pyrococcus furiosus [ATCC 43587] から常法に従いゲノム DNA を調製する。このゲノム DNA を鋳型にして、以下の合成オリゴ DNA をプライマーとして用いて PCR を行い、 1282 bp の DNA 増幅産物を得る。

5'-aataatGGATCCGgttgagcaagaccctatgaaattgttatt-3' (BamHI) [配列番号 1 0 0]

5'-aataatAAGCTTgtgcttgacctccacgggtcaagcattgc-3' (HindIII) [配列番号 1 0 1]

この DNA 増幅産物を制限酵素 BamHI および Hind III で切断し、pETDuet-1 (Novagen 社製) の同じ制限酵素サイトに挿入し、His-pfuEDH 発現ベクター pETDuet-pfuEDH を作製する。

40

【0342】

次に *Thermotoga maritima* [ATCC 43589] から常法に従いゲノム DNA を調製する。このゲノム DNA を鋳型にして、以下の合成オリゴ DNA :

5'-aataatCATATGtacgatgctgtgatcataggaggagacc-3' (NdeI) [配列番号 6 3]

5'-aataatCTCGAGtcacagatgaatgggttttctgagacccc-3' (XhoI) [配列番号 6 4]

をプライマーとして用いて PCR を行い、 1371 bp の DNA 増幅産物を得る。

この DNA 増幅産物を制限酵素 Nde I および Xho I で切断し、pETDuet-pfuEDH の同じ制限酵素サイトに挿入し、His-pfuEDH、tmaDp 共発現ベクター pETDuet-pfuEDH-tmaDp を作製する。

次に、以下の 5' 末端リン酸化合成オリゴ DNA を TE バッファー中で、等量混合し、加熱後徐

50

ゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、1560bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCATATGacggcatctctccgttgcaagtggcagcg-3' (NdeI) [配列番号109]

5'-aataatCTCGAGtcaggcgtccgccgaaccgccatacacatc-3' (XhoI) [配列番号110]

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pETDuet-sceADHの同じ制限酵素サイトに挿入し、His-sceADH、goxALDH共発現ベクターpETDuet-sceADH-goxALDHを作製する。

【0348】

次に、以下の5'末端リン酸化合成オリゴDNAをTEバッファー中で、等量混合し、加熱後徐冷することによってアニーリングする。

5'-AGCTTagcggcggcagcggcagcggcggcagcggcCA-3' [配列番号29]

5'-TATGgccgctgccgcccgtgccgctgccgcccgtA-3' [配列番号30]

このDNA断片を、pETDuet-sceADH-goxALDHの制限酵素Hind IIIおよびNde Iの認識サイトに挿入し、His-sceADHとgoxALDHがスパーサー配列SGGSGSGSGGによって連結された融合タンパク質His-sceADH::goxALDH発現ベクターpETDuet-sceADH::goxALDH [配列番号111]を作製する。

【0349】

次に*Saccharomyces cerevisiae* [ATCC 47058]のゲノムDNA鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、1073bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCCATGGcgtcgaagtcatctcgtgaaaaacaaaaggct-3' (Nco I) [配列番号32]

5'-aataatAAGCTTtttagaagtctcaacaacatatctaccaac-3' (HindIII) [配列番号28]

このDNA増幅産物を制限酵素Nco IおよびHind IIIで切断し、pCDFDuet-1 (Novagen社製)の同じ制限酵素サイトに挿入し、sceADH発現ベクターpCDFDuet-sceADHを作製する。

【0350】

次に*Gluconobacter oxydans* [ATCC 621H]のゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、1560bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCATATGacggcatctctccgttgcaagtggcagcg-3' (NdeI) [配列番号109]

5'-aataatCTCGAGtcaggcgtccgccgaaccgccatacacatc-3' (XhoI) [配列番号110]

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pCDFDuet-sceADHの同じ制限酵素サイトに挿入し、sceADH、goxALDH共発現ベクターpCDFDuet-sceADH-goxALDH [配列番号112]を作製する。

【0351】

発現ベクターpETDuet-sceADH::goxALDHおよびpCDFDuet-sceADH-goxALDHを用い、常法に従い*E. coli* BL21(DE3)を形質転換する。形質転換体は抗生物質アンピシリンおよびストレプトマイシンに対する耐性株として選別することができる。

【0352】

得られた形質転換体を抗生物質アンピシリン及びストレプトマイシンを添加したLB培地10mLで一晩プレ・カルチャーした後、その0.2mLを、100mLのLB-Amp培地に添加し、30、170rpmで4時間振とう培養する。その後IPTGを添加(終濃度1mM)し、37で412時間培養を続ける。IPTG誘導した形質転換体を集菌(8000×g、2分、4)し、1/10量の4PBSに再懸濁する。凍結融解およびソニケーションにより菌体を破碎し、遠心(8000×g、10分、4)して固形夾雑物を取り除く。目的の発現タンパク質が上清に存在することをSDS-PAGEで確認した後、誘導発現されたHisタグ融合タンパク質をニッケルキレートカラムを用いて精製する。

【0353】

次に*Pseudomonas putida* KT2440 [ATCC 47054]から常法に従いゲノムDNAを調製する。このゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、729bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCATATGcttgtgaatgtactgatcgtccacgctcac-3' (NdeI) [配列番号3]

5'-aataatCTCGAGcgtcagcgggtacaacgcttcatcgaa-3' (XhoI) [配列番号14]

10

20

30

40

50

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pET-21a(+) (Novagen社製)の同じ制限酵素サイトに挿入し、ppuDp-His発現ベクターpET21-ppuDpを作製する。

【0354】

発現ベクターpET21-ppuDpを、E.coli BL21(DE3)を常法に従い形質転換する。形質転換体は抗生物質アンピシリンに対する耐性株として選別することができる。

【0355】

得られた形質転換体を抗生物質アンピシリンを添加したLB培地10mLで一晩プレ・カルチャーした後、その0.2mLを、100mLのLB-Amp培地に添加し、30、170rpmで4時間振とう培養する。その後IPTGを添加(終濃度1mM)し、37で412時間培養を続ける。IPTG誘導した形質転換体を集菌(8000×g、2分、4)し、1/10量の4PBSに再懸濁する。凍結融解およびソニケーションにより菌体を破砕し、遠心(8000×g、10分、4)して固形夾雑物を取り除く。目的の発現タンパク質が上清に存在することをSDS-PAGEで確認した後、それぞれの誘導発現されたHisタグ融合タンパク質をニッケルキレートカラムを用いて精製する。

10

こうして得られた融合タンパク質をアルコールセンサー等に適用できる。

(比較例41:対照としてのsceADHおよびgoxALDHの調製)

Saccharomyces cerevisiae [ATCC 47058]から常法に従いゲノムDNAを調製する。このゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、約1074bpのDNA増幅産物を得る。

20

5'-aataatCATatgccttcgcaagtcattcctgaaaaacaaaag-3' (NdeI)[配列番号36]

5'-aataatCTCGAGtttagaagtcctcaacaacatatctaccaac-3' (XhoI)[配列番号37]

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pET-21a(+) (Novagen社製)の同じ制限酵素サイトに挿入し、sceADH-His発現ベクターpET21-sceADHを作製する。

【0356】

次にGluconobacter oxydans [ATCC 621H]から常法に従いゲノムDNAを調製する。このゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、1557bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCATATGacggcatctctccgttgcaagtgccagcg-3' (NdeI) [配列番号109]

5'-aataatCTCGAGggcgtccgccgaaccgccatacacatcgaa-3' (XhoI) [配列番号115]

30

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pET-21a(+) (Novagen社製)の同じ制限酵素サイトに挿入し、goxALDH-His発現ベクターpET21-goxALDHを作製する。

【0357】

次にPseudomonas putida KT2440 [ATCC 47054]から常法に従いゲノムDNAを調製する。このゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、729bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCATATGcttgtgaatgtactgatcgtccacgctcac-3' (NdeI) [配列番号3]

5'-aataatCTCGAGcgtcagcgggtacaacgcttcatcgaa-3' (XhoI) [配列番号14]

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pET-21a(+) (Novagen社製)の同じ制限酵素サイトに挿入し、ppuDp-His発現ベクターpET21-ppuDpを作製する。

40

【0358】

発現ベクターpET21-sceADH、pET21-goxALDHおよびpET21-ppuDpをそれぞれ個別に用い、E.coli BL21(DE3)を常法に従い形質転換する。形質転換体は抗生物質アンピシリンに対する耐性株として選別することができる。

【0359】

得られたそれぞれの形質転換体を抗生物質アンピシリンを添加したLB培地10mLで一晩プレ・カルチャーした後、その0.2mLを、100mLのLB-Amp培地に添加し、30、170rpmで4時間振とう培養する。その後IPTGを添加(終濃度1mM)し、37で412時間培養を続ける。IPTG誘導した形質転換体を集菌(8000×g、2分、4)し、1/10量の4PBSに再懸濁する。凍結融解およびソニケーションにより菌体を破砕し、遠心(8000×g、10分、4)

50

して固形夾雑物を取り除く。目的の発現タンパク質が上清に存在することをSDS-PAGEで確認した後、それぞれの誘導発現されたHisタグ融合タンパク質をニッケルキレートカラムを用いて精製する。

【0360】

(実施例42：アルコールセンサー)

図40および図8を用いて実施例42を説明する。実施例42にかかるセンサーは試料溶液中のアルコールを定量するアルコールセンサーである。実施例42に係るアルコールセンサーの酵素電極部を図40を用いて説明する。

【0361】

酵素電極部は以下の構成からなる。導電性基体20は直径3mmのグラッシーカーボンである。導電性基体20上に実施例41で調製した融合タンパク質(His-sceADH::goxALDH)、*Pseudomonas putida*由来のジアフォラーゼ(ppuDp)、及びフェロセン結合ポリアリルアミン(Fc-PAA)がPEGDEにより架橋されて固定されている。各成分は、それぞれ以下の最適の濃度により固定されている。すなわちHis-sceADH::goxALDH(sceADH:0.3ユニット、goxALDH:0.6ユニット)、ppuDp:0.6ユニット、Fc-PAA:16μg、PEGDE:10μgで調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で2時間以上放置、乾燥させることにより行う。

10

【0362】

この酵素電極部を、図8における作用電極4として用いることによってアルコールセンサーを構成する。対極5は白金線、参照極6は銀/塩化銀電極で構成する。これらの電極は、それぞれポテンショスタット10を介して電流などを測定する。試料溶液3としては、所定濃度のアルコール(エタノール)、および1mM NADを含む0.1M PIPES-NaOH緩衝水溶液(pH7.5)を用いる。測定温度は、恒温循環槽によって37に保持される。

20

【0363】

前述のアルコールセンサーを用いて次のように定量を行う。作用電極4には参照極6に対して300mVの電位を印加する。このとき、試料溶液3中のアルコールはアルコールデヒドロゲナーゼの存在下でアセトアルデヒドに酸化され、この反応でNADがNADHに還元される。次に前記アルコールデヒドロゲナーゼに融合したアルデヒドデヒドロゲナーゼの存在下でアセトアルデヒドはカルボン酸に酸化されると同時にNADがNADHに還元される。アルコールデヒドロゲナーゼおよびアルデヒドデヒドロゲナーゼの両酵素反応により生成したNADHはジアフォラーゼの存在下でNADに酸化され、この反応で電子伝達メディエータであるフェロセンが酸化され、フェリシニウムイオンが生成される。(作用電極4には参照極6に対して300mVの電位が印加されているため、)フェリシニウムイオンは作用電極4から電子をうけとりフェロセンに還元される。作用電極4での電子の移動による電流を測定することにより、試料溶液中のアルコール濃度を測定する。

30

【0364】

(比較例42：アルコールセンサー)

図42および図8を用いて比較例42を説明する。比較例42にかかるセンサーは試料溶液中のアルコールを定量するアルコールセンサーである。比較例42に係るアルコールセンサーの酵素電極部を図42を用いて説明する。

40

【0365】

酵素電極部は以下の構成からなる。導電性基体20は直径3mmのグラッシーカーボンである。導電性基体20上にアルコールデヒドロゲナーゼ(sceADH)、アルデヒドデヒドロゲナーゼ(goxALDH)、ジアフォラーゼ(ppuDp)、及びフェロセン結合ポリアリルアミン(Fc-PAA)がPEGDEにより架橋されて固定されている。アルコールデヒドロゲナーゼ(sceADH)は比較例41で調製した*Saccharomyces cerevisiae*由来のアルコールデヒドロゲナーゼである。アルデヒドデヒドロゲナーゼ(goxALDH)は、*Gluconobacter oxydans*由来のアルデヒドデヒドロゲナーゼである。ジアフォラーゼ(ppuDp)は、*Pseudomonas putida*由来のジアフォラーゼである。各成分は、それぞれ以下の最適の濃度により固定されて

50

いる。すなわちsceADH：0.3ユニット、goxALDH：0.6ユニット、ppuDp：0.6ユニット、Fc-PAA：16 μg、PEGDE：10 μgで調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で2時間以上放置、乾燥させることにより行う。

【0366】

この酵素電極部を用いて、実施例42と同様に測定した。実施例42と比較例42との相違は、図11のAとBの相違に類似する。

【0367】

実施例42と比較例42から、実施例42のアルコールセンサーの方が、比較例42のアルコールセンサーよりも、アルコール濃度に対する感度が高く、より低濃度のアルコールを定量出来ることが明らかとなった。酵素電極上に固定されているアルコールデヒドロゲナーゼ、アルデヒドデヒドロゲナーゼ及びジアフォラーゼの量は同じであるにもかかわらず、実施例42の酵素電極においては、アルコールデヒドロゲナーゼとアルデヒドデヒドロゲナーゼが融合しているために、両酵素が物理的近傍に保持されている。このため、単位時間内に生成するNADHの量が多いためと考えられた。

【0368】

(実施例43：アルコール燃料電池)

図40及び図9を用いて実施例43を説明する。実施例43にかかる燃料電池はアルコールを燃料とするアルコール燃料電池である。実施例43に係るアルコール燃料電池のアノード電極部を図40を用いて説明する。

【0369】

アノード電極部は以下の構成からなる。導電性基体20は0.5 cm²のグラッシーカーボンである。導電性基体20上に実施例41で調製した融合タンパク質(His-sceADH::goxALDH)、Pseudomonas putida由来のジアフォラーゼ(ppuDp)、及びフェロセン結合ポリアリルアミン(Fc-PAA)がPEGDEにより架橋されて固定されている。各成分は、それぞれ以下の最適の濃度比により導電性基体20上に固定されている。すなわち、His-sceADH::goxALDH(sceADH：0.3ユニット、goxALDH：0.6ユニット)、ppuDp：0.6ユニット、Fc-PAA：16 μg、PEGDE：10 μgで調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で2時間以上放置、乾燥させることにより行う。

【0370】

実施例43に係るアルコール燃料電池のカソード電極16は0.5 cm²の白金板からなる。電解質溶液3は、100 mM塩化ナトリウム、5 mMアルコール(エタノール)、および1 mMニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを含む50 mMリン酸緩衝液(pH 7.5)である。アノード電極15とカソード電極16は、間に多孔質ポリプロピレンフィルム(厚さ20 μm)17を挟んで配置され、これを蓋2付のウォータージャケットセル1中の前記電解液溶液3中(10 mL)に配置する。測定温度は、恒温循環槽によって37℃に保持される。それぞれのリードをポテンショスタット(東方技研、モデル2000)10に接続し、-1.2 Vから0.1 Vまで電圧を変化させ、電圧-電流特性を測定した。

短絡電流密度：1620 μA / cm²

最大電力：172 μW / cm²

の電池出力が観測される。

【0371】

(比較例43：アルコール燃料電池)

図42及び図9を用いて比較例43を説明する。比較例43にかかる燃料電池はアルコールを燃料とするアルコール燃料電池である。比較例43に係るアルコール燃料電池のアノード電極部を図42を用いて説明する。

【0372】

アノード電極部は以下の構成からなる。導電性基体20は0.5 cm²のグラッシーカーボンである。導電性基体20上にアルコールデヒドロゲナーゼ(sceADH)、アルデヒドデヒドロゲナーゼ(goxALDH)、ジアフォラーゼ(ppuDp)、及びフェロセン結合ポリアリ

10

20

30

40

50

ルアミン (Fc - PAA) が PEGDE により架橋されて固定されている。アルコールデヒドロゲナーゼ (sceADH) は、比較例 4 1 で調製した *Saccharomyces cerevisiae* 由来のアルコールデヒドロゲナーゼである。アルデヒドデヒドロゲナーゼ (goxALDH) は、*Gluconobacter oxydans* 由来のアルデヒドデヒドロゲナーゼである。Pseudomonas putida 由来のジアフォラーゼ (ppuDp) は、Pseudomonas putida 由来のジアフォラーゼである。各成分は、それぞれ以下の最適の濃度により導電性基体 20 上に固定されている。すなわち、sceADH: 0.3 ユニット、goxALDH: 0.6 ユニット、ppuDp: 0.6 ユニット、Fc-PAA: 16 μ g、PEGDE: 10 μ g で調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で 2 時間以上放置、乾燥させることにより行う。

【0373】

比較例 4 3 に係るアルコール燃料電池を用いて、実施例 4 3 と同様に、電圧 - 電流特性を測定した。

短絡電流密度: 502 μ A / cm^2

最大電力: 50 μ W / cm^2

の電池出力が観測される。

【0374】

実施例 4 3 と比較例 4 3 から、実施例 4 3 のアルコール燃料電池の方が、比較例 4 3 のアルコール燃料電池よりも、電流密度が高く、より大きな電流を取り出せることが明らかとなった。酵素電極上に固定されているアルコールデヒドロゲナーゼ、アルデヒドデヒドロゲナーゼ、およびジアフォラーゼの量は同じであるにもかかわらず、実施例 4 3 の燃料電池においては、アルコールデヒドロゲナーゼとアルデヒドデヒドロゲナーゼが融合しているために、両酵素が物理的隣りに保持されている。このため、単位時間内に生成する NADH の量が多いためと考えられた。

【0375】

(実施例 4 4 : アルコール電気化学反応装置)

図 4 0 および図 8 を用いて実施例 4 4 を説明する。実施例 4 4 にかかる電気化学反応装置はアルコール (エタノール) を基質としてカルボン酸 (酢酸) を生産するアルコール電気化学反応装置である。実施例 4 4 に係るアルコール電気化学反応装置の酵素電極部を図 4 0 を用いて説明する。

【0376】

酵素電極部は以下の構成からなる。導電性基体 20 は 0.5 cm^2 のグラッシーカーボンである。導電性基体 20 上に実施例 4 1 で調製した融合タンパク質 (His-sceADH::goxALDH)、Pseudomonas putida 由来のジアフォラーゼ (ppuDp)、及びフェロセン結合ポリアリルアミン (Fc - PAA) が PEGDE により架橋されて固定されている。各成分は、それぞれ以下の最適の濃度により固定されている。すなわち His-sceADH::goxALDH (sceADH: 0.3 ユニット、goxALDH: 0.6 ユニット)、ppuDp: 0.6 ユニット、Fc-PAA: 16 μ g、PEGDE: 10 μ g で調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で 2 時間以上放置、乾燥させることにより行う。

【0377】

この酵素電極を図 8 における作用電極 4 として用いることによってアルコール電気化学反応装置を構成する。銀塩化銀電極を参照電極 6 に、白金線に対極 5 とした三極セルを構成する。100 mM 塩化ナトリウム、5 mM アルコール、および 1 mM ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) 電解液を試料溶液 3 として使用し、恒温循環槽によって 37 $^{\circ}$ C に保持される。ウォータージャケットセル 1 中窒素雰囲気下 0.3 V vs Ag / AgCl の電位を 100 分間印加し、生成物を高速液体クロマトグラフィーで定量する。

【0378】

反応電解液からは、カルボン酸 (酢酸) が検出され、反応電荷量と、生成カルボン酸 (酢酸) 量には、高い相関関係があり、反応が定量的に進行することがわかる。

【0379】

10

20

30

40

50

(比較例 4 4 : アルコール電気化学反応装置)

図 4 2 および図 8 を用いて比較例 4 4 を説明する。比較例 4 4 にかかる電気化学反応装置はアルコール(エタノール)を基質としてカルボン酸(酢酸)を生産するアルコール電気化学反応装置である。比較例 4 4 にかかるアルコール電気化学反応装置の酵素電極部を図 4 2 を用いて説明する。

【0380】

酵素電極部は以下の構成からなる。導電性基体 20 は 0.5 cm^2 のグラッシーカーボンである。導電性基体 20 上にアルコールデヒドロゲナーゼ(sceADH)、アルデヒドデヒドロゲナーゼ(goxALDH)、ジアフォラーゼ(ppuDp)、及びフェロセン結合ポリアリルアミン(Fc-PAA)がPEGDEにより架橋されて固定されている。アルコールデヒドロゲナーゼ(sceADH)は、比較例 4 1 で調製した *Saccharomyces cerevisiae* 由来のアルコールデヒドロゲナーゼである。アルデヒドデヒドロゲナーゼ(goxALDH)は、*Gluconobacter oxydans* 由来のアルデヒドデヒドロゲナーゼである。ジアフォラーゼ(ppuDp)は、*Pseudomonas putida* 由来のジアフォラーゼである。各成分は、それぞれ以下の最適の濃度により固定されている。すなわちsceADH: 0.3 ユニット、goxALDH: 0.6 ユニット、ppuDp: 0.6 ユニット、Fc-PAA: $16 \mu\text{g}$ 、PEGDE: $10 \mu\text{g}$ で調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で2時間以上放置、乾燥させることにより行う。

10

【0381】

この酵素電極を用いて、実施例 4 4 と同様に、生成物を高速液体クロマトグラフィーで

20

【0382】

反応電解液からは、カルボン酸(酢酸)が検出され、反応電荷量と、生成カルボン酸(酢酸)量には、高い相関関係があり、反応が定量的に進行することがわかる。しかしながら実施例 4 4 の場合よりも単位時間あたりの反応電荷量は小さい値であることがわかる。実施例 4 4 と比較例 4 4 から、実施例 4 4 のアルコール電気化学反応装置の方が、比較例 4 4 のアルコール電気化学反応装置よりも、単位時間あたりの反応電荷量が高く、より効率的にアルコールをカルボン酸に変換出来ることが明らかとなる。酵素電極上に固定されているアルコールデヒドロゲナーゼ、アルデヒドデヒドロゲナーゼ、及びジアフォラーゼの量は同じであるにもかかわらず、実施例 4 4 の電気化学反応装置においては、アルコールデヒドロゲナーゼとアルデヒドデヒドロゲナーゼが融合しているために、両酵素が物理的

30

(実施例 4 5 : *Pyrococcus furiosus* 由来のアルコールデヒドロゲナーゼ(pfuADH)と *Thermus thermophilus* 由来のアルデヒドデヒドロゲナーゼ(tthALDH)との融合タンパク質(His-pfuADH::tthALDH) [配列番号 120、121]の調製)

Pyrococcus furiosus [ATCC 43587]から常法に従いゲノムDNAを調製する。このゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、 1147 bp のDNA増幅産物を得る。

40

5'-aataatGGATCCGtttttcctaaagactaagattatcgaggga-3' (BamHI) [配列番号 38]

5'-aataatAAGCTTatctccatagaaggccctctcataaattct-3' (HindIII) [配列番号 39]

このDNA増幅産物を制限酵素BamHIおよびHind IIIで切断し、pETDuet-1(Novagen社製)の同じ制限酵素サイトに挿入し、His-pfuADH発現ベクターpETDuet-pfuADHを作製する。

【0383】

次に *Thermus thermophilus* [ATCC BAA-163]から常法に従いゲノムDNAを調製する。このゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、 1614 bp のDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCATATGcgcaaggcggcaggcaagtacgggaacacc-3' (NdeI) [配列番号 116]

5'-aataatCTCGAGttaagccccagcacctccccccaggcggt-3' (XhoI) [配列番号 117]

50

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pETDuet-pfuADHの同じ制限酵素サイトに挿入し、His-pfuADH、tthALDH共発現ベクターpETDuet-pfuADH-tthALDHを作製する。

【0384】

次に、以下の5'末端リン酸化合成オリゴDNAをTEバッファー中で、等量混合し、加熱後徐冷することによってアニーリングする。

5'-AGCTTagcggcggcagcggcagcggcggcagcggcCA-3' [配列番号29]

5'-TATGgccgctgccgcccgtgccgctgccgcccgtA-3' [配列番号30]

このDNA断片を、pETDuet-pfuADH-tthALDHの制限酵素Hind IIIおよびNde Iの認識サイトに挿入し、His-pfuADHとtthALDHがスペーサー配列SGGSGGGSGによって連結された融合タンパク質His-pfuADH::tthALDH発現ベクターpETDuet-pfuADH::tthALDH [配列番号118]を作製する。

10

【0385】

次にPyrococcus furiosus [ATCC 43587]のゲノムDNA鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、1145bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCCATGGcgttcctaaagactaagattatcgagggaagg-3' (Nco I) [配列番号41]

5'-aataatAAGCTTatctccatagaaggccctctcataaattct-3' (HindIII) [配列番号39]

このDNA増幅産物を制限酵素Nco IおよびHind IIIで切断し、pCDFDuet-1 (Novagen社製)の同じ制限酵素サイトに挿入し、pfuADH発現ベクターpCDFDuet-pfuADHを作製する。

20

【0386】

次にThermus thermophilus [ATCC BAA-163]のゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、1614bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCATATGcgcaaggcggcaggcaagtacgggaacacc-3' (NdeI) [配列番号116]

5'-aataatCTCGAGttaaagccccagcacctccccccagggcgt-3' (XhoI) [配列番号117]

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pCDFDuet-pfuADHの同じ制限酵素サイトに挿入し、pfuADH、tthALDH共発現ベクターpCDFDuet-pfuADH-tthALDH [配列番号119]を作製する。

【0387】

発現ベクターpETDuet-pfuADH::tthALDHおよびpCDFDuet-pfuADH-tthALDHを用い、常法に従いE.coli BL21(DE3)を形質転換する。形質転換体は抗生物質アンピシリンおよびストレプトマイシンに対する耐性株として選別することができる。

30

【0388】

得られた形質転換体を抗生物質アンピシリン及びストレプトマイシンを添加したLB培地10mLで一晩プレ・カルチャーした後、その0.2mLを、100mLのLB-Amp培地に添加し、30、170rpmで4時間振とう培養する。その後IPTGを添加(終濃度1mM)し、37℃で412時間培養を続ける。IPTG誘導した形質転換体を集菌(8000×g、2分、4℃)し、1/10量の4×PBSに再懸濁する。凍結融解およびソニケーションにより菌体を破碎し、遠心(8000×g、10分、4℃)して固形夾雑物を取り除く。目的の発現タンパク質が上清に存在することをSDS-PAGEで確認した後、誘導発現されたHisタグ融合タンパク質をニッケルキレートカラムを用いて精製する。

40

【0389】

次にPyrococcus horikoshii KT2440 [ATCC 700860]から常法に従いゲノムDNAを調製する。このゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、1344bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCATATGaagatagtagttataggatctggaactgct-3' (NdeI) [配列番号17]

5'-aataatCTCGAGtgacttaaattttctcatggccatttc-3' (XhoI) [配列番号26]

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pET-21a(+) (Novagen社製)の同じ制限酵素サイトに挿入し、phoDp-His発現ベクターpET21-phoDpを作製する。

【0390】

発現ベクターpET21-phoDpを、E.coli BL21(DE3)を常法に従い形質転換する。形質転換

50

体は抗生物質アンピシリンに対する耐性株として選別することができる。

【0391】

得られた形質転換体を抗生物質アンピシリンを添加したLB培地10mLで一晩プレ・カルチャーした後、その0.2mLを、100mLのLB-Amp培地に添加し、30、170rpmで4時間振とう培養する。その後IPTGを添加（終濃度1mM）し、37で412時間培養を続ける。IPTG誘導した形質転換体を集菌（8000×g、2分、4）し、1/10量の4PBSに再懸濁する。凍結融解およびソニケーションにより菌体を破碎し、遠心（8000×g、10分、4）して固形夾雑物を取り除く。目的の発現タンパク質が上清に存在することをSDS-PAGEで確認した後、それぞれの誘導発現されたHisタグ融合タンパク質をニッケルキレートカラムを用いて精製する。

10

こうして得られた融合タンパク質をアルコールセンサー等に適用できる。

（実施例49：Bacillus subtilis由来のグルコースデヒドロゲナーゼ（busGDH）とEscherichia coli由来のキシロースイソメラーゼ（ecoISO）との融合タンパク質（His-busGDH::ecoISO）[配列番号127、128]の調製）

Bacillus subtilis [ATCC 27370]から常法に従いゲノムDNAを調製する。このゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、805bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatGGATCCGtatccggattttaaaggaaaagtcgctcgct-3' (BamHI) [配列番号1]

20

5'-aataatAAGCTTaccgcgccctgcctggaatgaaggatattg-3' (HindIII) [配列番号2]

このDNA増幅産物を制限酵素BamHIおよびHindIIIで切断し、pETDuet-1(Novagen社製)の同じ制限酵素サイトに挿入し、His-busGDH発現ベクターpETDuet-busGDHを作製する。

【0392】

次にEscherichia coli [ATCC 29425]から常法に従いゲノムDNAを調製する。このゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、1344bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCATATGcaagcctattttgaccagctcgatcgcggtt-3' (NdeI) [配列番号123]

5'-aataatCTCGAGttattttgtcgaacagataatggtttaccag-3' (XhoI) [配列番号124]

このDNA増幅産物を制限酵素NdeIおよびXhoIで切断し、pETDuet-busGDHの同じ制限酵素サイトに挿入し、His-busGDH、ecoISO共発現ベクターpETDuet-busGDH-ecoISOを作製する。

30

【0393】

次に、以下の5'末端リン酸化合成オリゴDNAをTEバッファー中で、等量混合し、加熱後徐冷することによってアニーリングする。

5'-AGCTTagcggcgccagcggcagcggcagcggcCA-3' [配列番号29]

5'-TATGgccgctgccgctgcccgtgcccgcctA-3' [配列番号30]

このDNA断片を、pETDuet-busGDH-ecoISOの制限酵素HindIIIおよびNdeIの認識サイトに挿入し、His-busGDHとecoISOがスペーサー配列SGGSGSGGSGによって連結された融合タンパク質His-busGDH::ecoISO発現ベクターpETDuet-busGDH::ecoISO [配列番号125]を作製する。

40

【0394】

次にBacillus subtilis [ATCC 27370]のゲノムDNA鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、805bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCCATGGcgcgcccggattttaaaggaaaagtcgctcgctattacagga-3' (NcoI) [配列番号8]

5'-aataatAAGCTTaccgcgccctgcctggaatgaaggatattg-3' (HindIII) [配列番号2]

このDNA増幅産物を制限酵素NcoIおよびHindIIIで切断し、pCDFDuet-1(Novagen社製)の同じ制限酵素サイトに挿入し、busGDH発現ベクターpCDFDuet-busGDHを作製する。

【0395】

次にEscherichia coli [ATCC 29425]のゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNA

50

をプライマーとして用いてPCRを行い、1344bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCATATGcaagcctattttgaccagctcgatcgcggtt-3' (NdeI) [配列番号123]

5'-aataatCTCGAGttattttgtcgaacagataatggtttaccag-3' (XhoI) [配列番号124]

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pCDFDuet-busGDHの同じ制限酵素サイトに挿入し、busGDH、ecoISO共発現ベクターpCDFDuet-busGDH-ecoISO [配列番号126]を作製する。

【0396】

発現ベクターpETDuet-busGDH::ecoISOおよびpCDFDuet-busGDH-ecoISOを常法に従いE. coli BL21(DE3)に形質転換する。形質転換体は抗生物質アンピシリンおよびストレプトマイシンに対する耐性株として選別することができる。

10

【0397】

得られた形質転換体を抗生物質アンピシリン及びストレプトマイシンを添加したLB培地10mLで一晩プレ・カルチャーした後、その0.2mLを、100mLのLB-Amp培地に添加し、30、170rpmで4時間振とう培養する。その後IPTGを添加(終濃度1mM)し、37℃で412時間培養を続ける。IPTG誘導した形質転換体を集菌(8000×g、2分、4℃)し、1/10量の4℃PBSに再懸濁する。凍結融解およびソニケーションにより菌体を破碎し、遠心(8000×g、10分、4℃)して固形夾雑物を取り除く。目的の発現タンパク質が上清に存在することをSDS-PAGEで確認した後、誘導発現されたHisタグ融合タンパク質をニッケルキレートカラムを用いて精製する。

【0398】

次にPseudomonas putida KT2440 [ATCC 47054]から常法に従いゲノムDNAを調製する。このゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、729bpのDNA増幅産物を得る。

20

5'-aataatCATATGcttgtgaatgtactgatcgctccacgctcac-3' (NdeI) [配列番号3]

5'-aataatCTCGAGcgtcagcgggtacaacgcttcatcgaa-3' (XhoI) [配列番号14]

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pET-21a(+) (Novagen社製)の同じ制限酵素サイトに挿入し、ppuDp-His発現ベクターpET21-ppuDpを作製する。

【0399】

発現ベクターpET21-ppuDpを用いて、E. coli BL21(DE3)を常法に従い形質転換する。形質転換体は抗生物質アンピシリンに対する耐性株として選別することができる。

30

【0400】

得られた形質転換体を抗生物質アンピシリンを添加したLB培地10mLで一晩プレ・カルチャーした後、その0.2mLを、100mLのLB-Amp培地に添加し、30、170rpmで4時間振とう培養する。その後IPTGを添加(終濃度1mM)し、37℃で412時間培養を続ける。IPTG誘導した形質転換体を集菌(8000×g、2分、4℃)し、1/10量の4℃PBSに再懸濁する。凍結融解およびソニケーションにより菌体を破碎し、遠心(8000×g、10分、4℃)して固形夾雑物を取り除く。目的の発現タンパク質が上清に存在することをSDS-PAGEで確認した後、それぞれの誘導発現されたHisタグ融合タンパク質をニッケルキレートカラムを用いて精製する。

【0401】

(比較例49:対照としてのbusGDHおよびecoISOの調製)

Bacillus subtilis [ATCC 27370]から常法に従いゲノムDNAを調製する。このゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、約800bpのDNA増幅産物を得る。

40

5'-aataatCATatgtatccggattttaaaaggaaaagtcgctcgct-3' (NdeI) [配列番号12]

5'-aataatCTCGAGaccgcggcctgcctggaatgaaggatattg-3' (XhoI) [配列番号13]

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pET-21a(+) (Novagen社製)の同じ制限酵素サイトに挿入し、busGDH-His発現ベクターpET21-busGDHを作製する。

【0402】

次にEscherichia coli [ATCC 29425]から常法に従いゲノムDNAを調製する。このゲノ

50

Δ DNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、1341 bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCATATGcaagcctatgttgaccagctcgatcgcggtt-3' (NdeI) [配列番号123]

5'-aataatCTCGAGtttgtcgaacagataatggtttaccagatt-3' (XhoI) [配列番号129]

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pET-21a(+) (Novagen社製)の同じ制限酵素サイトに挿入し、ecoIS0-His発現ベクターpET21-ecoIS0を作製する。

【0403】

次にPseudomonas putida KT2440 [ATCC 47054]から常法に従いゲノムDNAを調製する。このゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、729 bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCATATGcttgtgaatgtactgatcgctccacgctcac-3' (NdeI) [配列番号3]

5'-aataatCTCGAGcgtcagcgggtacaacgcttcatcgaa-3' (XhoI) [配列番号14]

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pET-21a(+) (Novagen社製)の同じ制限酵素サイトに挿入し、ppuDp-His発現ベクターpET21-ppuDpを作製する。

【0404】

発現ベクターpET21-busGDH、pET21-ecoIS0およびpET21-ppuDpをそれぞれ個別に用い、E. coli BL21(DE3)を常法に従い形質転換する。形質転換体は抗生物質アンピシリンに対する耐性株として選別することができる。

【0405】

得られたそれぞれの形質転換体を抗生物質アンピシリンを添加したLB培地10mLで一晩ブレ・カルチャーした後、その0.2mLを、100mLのLB-Amp培地に添加し、30、170rpmで4時間振とう培養する。その後IPTGを添加(終濃度1mM)し、37で412時間培養を続ける。IPTG誘導した形質転換体を集菌(8000×g、2分、4)し、1/10量の4 PBSに再懸濁する。凍結融解およびソニケーションにより菌体を破砕し、遠心(8000×g、10分、4)して固形夾雑物を取り除く。目的の発現タンパク質が上清に存在することをSDS-PAGEで確認した後、それぞれの誘導発現されたHisタグ融合タンパク質をニッケルキレートカラムを用いて精製する。

【0406】

(実施例50：フルクトースセンサー)

図46および図8を用いて実施例50を説明する。実施例50にかかるセンサーは試料溶液中のフルクトースを定量するフルクトースセンサーである。実施例50に係るフルクトースセンサーの酵素電極部を図46を用いて説明する。

【0407】

酵素電極部は以下の構成からなる。導電性基体20は直径3mmのグラッシーカーボンである。導電性基体20上に実施例49で調製した融合タンパク質(His-busGDH::ecoIS0)、ジアフォラーゼ(ppuDp)、及びフェロセン結合ポリアリルアミン(Fc-PAA)がPEGDEにより架橋されて固定されている。ジアフォラーゼ(ppuDp)はPseudomonas putida由来のジアフォラーゼである。各成分は、それぞれ以下の最適の濃度により固定されている。すなわちHis-busGDH::ecoIS0(busGDH:0.3ユニット、ecoIS0:0.6ユニット)、ppuDp:0.6ユニット、Fc-PAA:16μg、PEGDE:10μgで調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で2時間以上放置、乾燥させることにより行う。

【0408】

この酵素電極部を、図8における作用電極4として用いることによってフルクトースセンサーを構成する。対極5は白金線、参照極6は銀/塩化銀電極で構成する。これらの電極は、それぞれポテンショスタット10を介して電流などを測定する。試料溶液3としては、所定濃度のフルクトース、および1mM NADを含む0.1M PIPES-NaOH緩衝水溶液(pH7.5)を用いる。測定温度は、恒温循環槽によって37に保持される。

【0409】

前述のフルクトースセンサーを用いて次のように定量を行う。作用電極4には参照極6

10

20

30

40

50

に対して300 mVの電位を印加する。このとき、試料溶液3中のフルクトースはキシロースイソメラーゼの存在下でグルコースに変換される。次に前記キシロースイソメラーゼに融合したグルコースデヒドロゲナーゼの存在下でグルコースはグルコノラクトンに酸化されると同時にNADがNADHに還元される。生成したNADHはジアフォラーゼの存在下でNADに酸化され、この反応で電子伝達メディエータであるフェロセンが酸化され、フェリシニウムイオンが生成される。(作用電極4には参照極6に対して300 mVの電位が印加されているため、)フェリシニウムイオンは作用電極4から電子を受けとりフェロセンに還元される。作用電極4での電子の移動による電流を測定することにより、試料溶液中のフルクトース濃度を測定する。

【0410】

10

(比較例50：フルクトースセンサー)

図48および図8を用いて比較例50を説明する。比較例50にかかるセンサーは試料溶液中のフルクトースを定量するフルクトースセンサーである。比較例50に係るフルクトースセンサーの酵素電極部を図48を用いて説明する。

【0411】

酵素電極部は以下の構成からなる。導電性基体20は直径3 mmのグラッシーカーボンである。導電性基体20上にグルコースデヒドロゲナーゼ(busGDH)、キシロースイソメラーゼ(ecolS0)、ジアフォラーゼ(ppuDp)、及びフェロセン結合ポリアリルアミン(Fc-PAA)がPEGDEにより架橋されて固定されている。グルコースデヒドロゲナーゼ(busGDH)は、比較例49で調製したBacillus subtilis由来のグルコースデヒドロゲナーゼである。キシロースイソメラーゼ(ecolS0)は、Escherichia coli由来のキシロースイソメラーゼである。ジアフォラーゼ(ppuDp)は、Pseudomonas putida由来のジアフォラーゼである。各成分は、それぞれ以下の最適の濃度により固定されている。すなわちbusGDH：0.3ユニット、ecolS0：0.6ユニット、ppuDp：0.6ユニット、Fc-PAA：16 µg、PEGDE：10 µgで調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で2時間以上放置、乾燥させることにより行う。

20

【0412】

この酵素電極部を用いて、実施例50と同様に、試料溶液中のフルクトース濃度を測定する。実施例50と比較例50との相違は、図11のAとBの相違と同様である。

【0413】

30

実施例50と比較例50から、実施例50のフルクトースセンサーの方が、比較例50のフルクトースセンサーよりも、フルクトース濃度に対する感度が高く、より低濃度のフルクトースを定量出来ることが明らかとなった。酵素電極上に固定されているグルコースデヒドロゲナーゼ、キシロースイソメラーゼ及びジアフォラーゼの量は同じであるにもかかわらず、実施例50の酵素電極においては、グルコースデヒドロゲナーゼとキシロースイソメラーゼが融合しているために、両酵素が物理的近傍に保持されている。このため、グルコースを介したフルクトースからグルコノラクトンへの変換・酸化反応が速やかに行われ、結果として単位時間内に生成するNADHの量が多いためと考えられた。

【0414】

(実施例51：フルクトース燃料電池)

40

図46及び図9を用いて実施例51を説明する。実施例51にかかる燃料電池はフルクトースを燃料とするフルクトース燃料電池である。実施例51に係るフルクトース燃料電池のアノード電極部を図46を用いて説明する。

【0415】

アノード電極部は以下の構成からなる。導電性基体20は0.5 cm²のグラッシーカーボンである。導電性基体20上に実施例49で調製した融合タンパク質(His-busGDH::ecolS0)、Pseudomonas putida由来のジアフォラーゼ(ppuDp)、及びフェロセン結合ポリアリルアミン(Fc-PAA)がPEGDEにより架橋されて固定されている。各成分は、それぞれ以下の最適の濃度比により導電性基体20上に固定されている。すなわち、His-busGDH::ecolS0(busGDH：0.3ユニット、ecolS0：0.6ユニット)、ppuDp：0.6ユニッ

50

ト、Fc-PAA：16 μg 、PEGDE：10 μg で調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で2時間以上放置、乾燥させることにより行う。実施例51に係るフルクトース燃料電池のカソード電極16は0.5 cm^2 の白金板からなる。

【0416】

電解質溶液3は、100 mM塩化ナトリウム、5 mMフルクトース、および1 mMニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを含む50 mMリン酸緩衝液(pH7.5)である。アノード電極15とカソード電極16は、間に多孔質ポリプロピレンフィルム(厚さ20 μm)17を挟んで配置され、これを蓋2付のウォータージャケットセル1中の前記電解液溶液3中(10 mL)に配置する。測定温度は、恒温循環槽によって37に保持される。それぞれのリードをポテンショスタット(東方技研、モデル2000)10に接続し、-1.2 Vから0.1 Vまで電圧を変化させ、電圧-電流特性を測定した。

短絡電流密度：1105 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$

最大電力：100 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$

の電池出力が観測される。

【0417】

(比較例51：フルクトース燃料電池)

図48及び図9を用いて比較例51を説明する。比較例51にかかる燃料電池はフルクトースを燃料とするフルクトース燃料電池である。比較例51に係るフルクトース燃料電池のアノード電極部を図48を用いて説明する。

【0418】

アノード電極部は以下の構成からなる。導電性基体20は0.5 cm^2 のグラッシーカーボンである。導電性基体20上にグルコースデヒドロゲナーゼ(busGDH)、キシロースイソメラーゼ(ecolS0)、ジアフォラーゼ(ppuDp)、及びフェロセン結合ポリアリルアミン(Fc-PAA)がPEGDEにより架橋されて固定されている。グルコースデヒドロゲナーゼ(busGDH)は、比較例49で調製した*Bacillus subtilis*由来のグルコースデヒドロゲナーゼである。キシロースイソメラーゼ(ecolS0)は、*Escherichia coli*由来のキシロースイソメラーゼである。ジアフォラーゼ(ppuDp)は、*Pseudomonas putida*由来のジアフォラーゼである。各成分は、それぞれ以下の最適の濃度により導電性基体20上に固定されている。すなわち、busGDH：0.3ユニット、ecolS0：0.6ユニット、ppuDp：0.6ユニット、Fc-PAA：16 μg 、PEGDE：10 μg で調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で2時間以上放置、乾燥させることにより行う。

【0419】

比較例51に係るフルクトース燃料電池を用いて、実施例50と同様に、電圧-電流特性を測定した。

短絡電流密度：309 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$

最大電力：30 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$

の電池出力が観測される。

【0420】

実施例51と比較例51から、実施例51のフルクトース燃料電池の方が、比較例51のフルクトース燃料電池よりも、電流密度が高く、より大きな電流を取り出せることが明らかとなった。酵素電極上に固定されているグルコースデヒドロゲナーゼ、キシロースイソメラーゼ、およびジアフォラーゼの量は同じであるにもかかわらず、実施例51の燃料電池においては、グルコースデヒドロゲナーゼとキシロースイソメラーゼが融合しているために、両酵素が物理的近傍に保持されている。このため、グルコースを介したフルクトースからグルコノラクトンへの変換・酸化反応が速やかに行われ、結果として単位時間内に生成するNADHの量が多いためと考えられた。

【0421】

(実施例52：フルクトース電気化学反応装置)

10

20

30

40

50

図46および図8を用いて実施例52を説明する。実施例52にかかる電気化学反応装置はフルクトースを基質としてグルコノラクトンを生産するフルクトース電気化学反応装置である。実施例52に係るフルクトース電気化学反応装置の酵素電極部を図46を用いて説明する。

【0422】

酵素電極部は以下の構成からなる。導電性基体20は 0.5 cm^2 のグラッシーカーボンである。導電性基体20上に実施例49で調製した融合タンパク質(His-busGDH::*ecolS0*)、*Pseudomonas putida*由来のジアフォラーゼ(ppuDp)、及びフェロセン結合ポリアリルアミン(Fc-PAA)がPEGDEにより架橋されて固定されている。各成分は、それぞれ以下の最適の濃度により固定されている。すなわちHis-busGDH::*ecolS0*(busGDH: 0.3ユニット、*ecolS0*: 0.6ユニット)、ppuDp: 0.6ユニット、Fc-PAA: $16\text{ }\mu\text{g}$ 、PEGDE: $10\text{ }\mu\text{g}$ で調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で2時間以上放置、乾燥させることにより行う。

10

【0423】

この酵素電極を図8における作用電極4として用いることによってフルクトース電気化学反応装置を構成する。銀塩化銀電極を参照電極6に、白金線を対極5とした三極セルを構成する。100mM塩化ナトリウム、5mMフルクトース、および1mMニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを含む50mMリン酸緩衝液(pH7.5)電解液を試料溶液3として使用し、恒温循環槽によって37℃に保持される。ウォータージャケットセル1中窒素雰囲気下0.3V vs Ag/AgClの電位を100分間印加し、生成物を高速液体クロマトグラフィーで定量する。反応電解液からは、グルコノラクトンが検出され、反応電荷量と、生成グルコノラクトン量には、高い相関関係があり、反応が定量的に進行することがわかる。

20

【0424】

(比較例52:フルクトース電気化学反応装置)

図48および図8を用いて比較例52を説明する。比較例4にかかる電気化学反応装置はフルクトースを基質としてグルコノラクトンを生産するフルクトース電気化学反応装置である。比較例52にかかるフルクトース電気化学反応装置の酵素電極部を図48を用いて説明する。

【0425】

酵素電極部は以下の構成からなる。導電性基体20は 0.5 cm^2 のグラッシーカーボンである。導電性基体20上にグルコースデヒドロゲナーゼ(busGDH)、キシロースイソメラーゼ(*ecolS0*)、ジアフォラーゼ(ppuDp)、及びフェロセン結合ポリアリルアミン(Fc-PAA)がPEGDEにより架橋されて固定されている。グルコースデヒドロゲナーゼ(busGDH)は、比較例49で調製した*Bacillus subtilis*由来のグルコースデヒドロゲナーゼである。キシロースイソメラーゼ(*ecolS0*)は、*Escherichia coli*由来のキシロースイソメラーゼである。ジアフォラーゼ(ppuDp)は、*Pseudomonas putida*由来のジアフォラーゼである。各成分は、それぞれ以下の最適の濃度により固定されている。すなわちbusGDH: 0.3ユニット、*ecolS0*: 0.6ユニット、ppuDp: 0.6ユニット、Fc-PAA: $16\text{ }\mu\text{g}$ 、PEGDE: $10\text{ }\mu\text{g}$ で調製されている。酵素電極部の作製は上記成分の各水溶液を電極上で混合後、室温で2時間以上放置、乾燥させることにより行う。

30

40

【0426】

この酵素電極を用いて、実施例52と同様に、生成物を高速液体クロマトグラフィーで定量する。

【0427】

反応電解液からは、グルコノラクトンが検出され、反応電荷量と、生成グルコノラクトン量には、高い相関関係があり、反応が定量的に進行することがわかる。しかしながら実施例52の場合よりも単位時間あたりの反応電荷量は小さい値であることがわかる。実施例52と比較例52から、実施例52のフルクトース電気化学反応装置の方が、比較例52のフルクトース電気化学反応装置よりも、単位時間あたりの反応電荷量が高く、よ

50

り効率的にフルクトースをグルコノラクトンに変換出来ることが明らかとなる。酵素電極上に固定されているグルコースデヒドロゲナーゼ、キシロースイソメラーゼ、及びジアフォラーゼの量は同じであるにもかかわらず、実施例52の電気化学反応装置においては、グルコースデヒドロゲナーゼとキシロースイソメラーゼが融合しているために、両酵素が物理的近傍に保持されている。このため、グルコースを介したフルクトースからグルコノラクトンへの変換・酸化反応が速やかに行われ、結果として単位時間内に生成するNADHの量が多いためと考えられた。

(実施例53: *Pyrococcus furiosus*由来のグルコースデヒドロゲナーゼ (pfuGDH) と *Thermotoga maritima*由来のキシロースイソメラーゼ (tmaISO) との融合タンパク質 (His-pfuGDH::tmaISO) [配列番号134、135]の調製) 10

Pyrococcus furiosus [ATCC 43587]から常法に従いゲノムDNAを調製する。このゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、799bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatGGATCCGaacatttttaataacagcttcttcaagagga-3' (BamHI) [配列番号15]

5'-aataatAAGCTTaagaagaacgctcctagtcattgctccatc-3' (HindIII) [配列番号16]

このDNA増幅産物を制限酵素BamHIおよびHind IIIで切断し、pETDuet-1(Novagen社製)の同じ制限酵素サイトに挿入し、His-pfuGDH発現ベクターpETDuet-pfuGDHを作製する。

【0428】

次に *Thermotoga maritima* [ATCC 43589]から常法に従いゲノムDNAを調製する。このゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、1356bpのDNA増幅産物を得る。 20

5'-aataatCATATGgcagaatttttccagaaatcccaaagatt-3' (NdeI) [配列番号130]

5'-aataatCTCGAGtcacctcagttctgctattgtcttccactat-3' (XhoI) [配列番号131]

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pETDuet-pfuGDHの同じ制限酵素サイトに挿入し、His-pfuGDH、tmaISO共発現ベクターpETDuet-pfuGDH-tmaISOを作製する。

【0429】

次に、以下の5'末端リン酸化合成オリゴDNAをTEバッファー中で、等量混合し、加熱後徐冷することによってアニーリングする。 30

5'-AGCTTagcggcgagcggcagcggcagcggcagcggcCA-3' [配列番号29]

5'-TATGccgctgccgctgccgctgccgctgccgctA-3' [配列番号30]

このDNA断片を、pETDuet-pfuGDH-tmaISOの制限酵素Hind IIIおよびNde Iの認識サイトに挿入し、His-pfuGDHとtmaISOがスパーサー配列SGGSGSGGSGによって連結された融合タンパク質His-pfuGDH::tmaISO発現ベクターpETDuet-pfuGDH::tmaISO [配列番号132]を作製する。

【0430】

次に *Pyrococcus furiosus* [ATCC 43587]のゲノムDNA鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、797bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCCATGGcgatttttaataacagcttcttcaagaggaataggcttc-3' (Nco I) [配列番号20] 40

5'-aataatAAGCTTaagaagaacgctcctagtcattgctccatc-3' (HindIII) [配列番号16]

このDNA増幅産物を制限酵素Nco IおよびHind IIIで切断し、pCDFDuet-1 (Novagen社製)の同じ制限酵素サイトに挿入し、pfuGDH発現ベクターpCDFDuet-pfuGDHを作製する。

【0431】

次に *Thermotoga maritima* [ATCC 43589]のゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、1356bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCATATGgcagaatttttccagaaatcccaaagatt-3' (NdeI) [配列番号130]

5'-aataatCTCGAGtcacctcagttctgctattgtcttccactat-3' (XhoI) [配列番号131]

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pCDFDuet-pfuGDHの同じ制限酵素サイトに挿入し、pfuGDH、tmaISO共発現ベクターpCDFDuet-pfuGDH-tmaISO [配列番号1 50

33]を作製する。

【0432】

発現ベクター-pETDuet-pfuGDH::tmaISOおよびpCDFDuet-pfuGDH-tmaISOを用い、常法に従いE.coli BL21(DE3)を形質転換する。形質転換体は抗生物質アンピシリンおよびストレプトマイシンに対する耐性株として選別することができる。

【0433】

得られた形質転換体を抗生物質アンピシリン及びストレプトマイシンを添加したLB培地10mLで一晩プレ・カルチャーした後、その0.2mLを、100mLのLB-Amp培地に添加し、30、170rpmで4時間振とう培養する。その後IPTGを添加(終濃度1mM)し、37℃で412時間培養を続ける。IPTG誘導した形質転換体を集菌(8000×g、2分、4℃)し、1/10量の400mL PBSに再懸濁する。凍結融解およびソニケーションにより菌体を破碎し、遠心(8000×g、10分、4℃)して固形夾雑物を取り除く。目的の発現タンパク質が上清に存在することをSDS-PAGEで確認した後、誘導発現されたHisタグ融合タンパク質をニッケルキレートカラムを用いて精製する。

10

【0434】

次にPyrococcus horikoshii KT2440 [ATCC 700860]から常法に従いゲノムDNAを調製する。このゲノムDNAを鋳型にして、以下の合成オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、1344bpのDNA増幅産物を得る。

5'-aataatCATATGaagatagtagttataggatctggaactgct-3' (NdeI) [配列番号17]

5'-aataatCTCGAGtgacttaaattttctcatggccatttc-3' (XhoI) [配列番号26]

20

このDNA増幅産物を制限酵素Nde IおよびXho Iで切断し、pET-21a(+) (Novagen社製)の同じ制限酵素サイトに挿入し、phoDp-His発現ベクター-pET21-phoDpを作製する。

【0435】

発現ベクター-pET21-phoDpを用い、E.coli BL21(DE3)を常法に従い形質転換する。形質転換体は抗生物質アンピシリンに対する耐性株として選別することができる。

【0436】

得られた形質転換体を抗生物質アンピシリンを添加したLB培地10mLで一晩プレ・カルチャーした後、その0.2mLを、100mLのLB-Amp培地に添加し、30、170rpmで4時間振とう培養する。その後IPTGを添加(終濃度1mM)し、37℃で412時間培養を続ける。IPTG誘導した形質転換体を集菌(8000×g、2分、4℃)し、1/10量の400mL PBSに再懸濁する。凍結融解およびソニケーションにより菌体を破碎し、遠心(8000×g、10分、4℃)して固形夾雑物を取り除く。目的の発現タンパク質が上清に存在することをSDS-PAGEで確認した後、それぞれの誘導発現されたHisタグ融合タンパク質をニッケルキレートカラムを用いて精製する。

30

こうして得られる好熱菌由来の融合タンパク質をフルクトースセンサーや燃料電池に適用できる。

【0437】

こうして得られる好熱菌由来の融合タンパク質を用いて、既述の実施例のようにフルクトースセンサー等を構成することができる。

【0438】

以上、複数の実施例及び比較例を用いて説明したが、好熱菌由来の融合タンパク質を用いたセンサーや燃料電池の方が、時間経過に対する出力の低下は少なく、また耐久性にもすぐれている。

40

【図面の簡単な説明】

【0439】

【図1】本発明の酵素電極における一形態として、グルコースデヒドロゲナーゼ(GDH)とジアフォラーゼ(Dp)との融合タンパク質を構成要素とする酵素電極の概念図である。

【図2】本発明の酵素電極における一形態として、アルコールデヒドロゲナーゼ(ADH)とジアフォラーゼ(Dp)との融合タンパク質を構成要素とする酵素電極の概念図である。

【図3】本発明の酵素電極における一形態として、乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)とジア

50

フォラーゼ (Dp) との融合タンパク質を構成要素とする酵素電極の概念図である。

【図 4】本発明酵素電極における一形態として、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (MDH) とジアフォラーゼ (Dp) との融合タンパク質を構成要素とする酵素電極の概念図である。

【図 5】本発明の酵素電極における一形態として、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (EDH) とジアフォラーゼ (Dp) との融合タンパク質を構成要素とする酵素電極の概念図である。

【図 6】本発明の酵素電極における一形態として、アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) とアルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH) との融合タンパク質を構成要素とする酵素電極の概念図である。

【図 7】本発明の酵素電極における一形態として、イソメラーゼ (ISO) とグルコースデヒドロゲナーゼ (GDH) との融合タンパク質を構成要素とする酵素電極の概念図である。

【図 8】本発明の酵素電極を用いて構成したセンサーの概念図である。

【図 9】本発明の酵素電極を用いて構成した燃料電池の概念図である。

【図 10】本発明の実施例に係るグルコースデヒドロゲナーゼとジアフォラーゼとの融合タンパク質を構成要素とする酵素電極部の概念図である。

【図 11】実施例 2 に係るグルコースセンサーを用いて測定された基質濃度と電流密度の関係を示す図である。

【図 12】本発明の比較例に係るグルコースデヒドロゲナーゼとジアフォラーゼとを構成要素とする酵素電極部の概念図である。

【符号の説明】

【0440】

1 ウォータージャケットセル

2 蓋

3 試料溶液

4 作用電極

5 白金線対極

6 銀塩化銀参照電極

7 作用極リード

8 対極リード

9 参照極リード

10 ポテンシオスタット

11 ガス吹込み口

12 ガスチューブ

13 温調水流入口

14 温調水排出口

15 アノード

16 カソード

17 多孔質ポリプロピレンフィルム

18 ガス排出口

19 電解質溶液

20 導電性基体

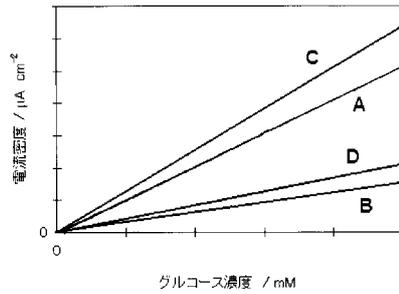
10

20

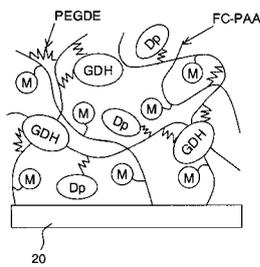
30

40

【図 1 1】



【図 1 2】



【配列表】

2007163185000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成18年1月6日(2006.1.6)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項7】

前記デヒドロゲナーゼとジアフォラーゼとの融合タンパク質が、以下の(a)または(b)のアミノ酸配列を有し、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性およびジアフォラーゼ活性を有することを特徴とする請求項1から4のいずれかに記載の酵素電極；

(a) 配列番号11で表されるアミノ酸配列、

(b) 配列番号11で表されるアミノ酸配列において、前記の各活性が損なわれない範囲で、1から複数個のアミノ酸の付加、欠失または置換の修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。

【手続補正2】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項8】

前記デヒドロゲナーゼとジアフォラーゼとの融合タンパク質が、以下の(a)または(b)のアミノ酸配列を有し、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性およびジアフォラーゼ

活性を有することを特徴とする請求項 1 から 4 のいずれかに記載の酵素電極；

(a) 配列番号 2 3 で表されるアミノ酸配列、

(b) 配列番号 2 3 で表されるアミノ酸配列において、前記の各活性が損なわれない範囲で、1 から複数個のアミノ酸の付加、欠失または置換の修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。

【**手続補正 3**】

【**補正対象書類名**】特許請求の範囲

【**補正対象項目名**】請求項 9

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【**請求項 9**】

前記デヒドロゲナーゼとジアフォラーゼとの融合タンパク質が、以下の (a) または (b) のアミノ酸配列を有し、かつアルコールデヒドロゲナーゼ活性およびジアフォラーゼ活性を有することを特徴とする請求項 1 から 4 のいずれかに記載の酵素電極；

(a) 配列番号 3 5 で表されるアミノ酸配列、

(b) 配列番号 3 5 で表されるアミノ酸配列において、前記の各活性が損なわれない範囲で、1 から複数個のアミノ酸の付加、欠失または置換の修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。

【**手続補正 4**】

【**補正対象書類名**】特許請求の範囲

【**補正対象項目名**】請求項 1 0

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【**請求項 1 0**】

前記デヒドロゲナーゼとジアフォラーゼとの融合タンパク質が、以下の (a) または (b) のアミノ酸配列を有し、かつアルコールデヒドロゲナーゼ活性およびジアフォラーゼ活性を有することを特徴とする請求項 1 から 4 のいずれかに記載の酵素電極；

(a) 配列番号 4 4 で表されるアミノ酸配列、

(b) 配列番号 4 4 で表されるアミノ酸配列において、前記の各活性が損なわれない範囲で、1 から複数個のアミノ酸の付加、欠失または置換の修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。

【**手続補正 5**】

【**補正対象書類名**】特許請求の範囲

【**補正対象項目名**】請求項 1 1

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【**請求項 1 1**】

前記デヒドロゲナーゼとジアフォラーゼとの融合タンパク質が、以下の (a) または (b) のアミノ酸配列を有し、かつ乳酸デヒドロゲナーゼ活性およびジアフォラーゼ活性を有することを特徴とする請求項 1 から 4 のいずれかに記載の酵素電極；

(a) 配列番号 5 7 で表されるアミノ酸配列、

(b) 配列番号 5 7 で表されるアミノ酸配列において、前記の各活性が損なわれない範囲で、1 から複数個のアミノ酸の付加、欠失または置換の修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。

【**手続補正 6**】

【**補正対象書類名**】特許請求の範囲

【**補正対象項目名**】請求項 1 2

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【**請求項 1 2**】

前記デヒドロゲナーゼとジアフォラーゼとの融合タンパク質が、以下の（a）または（b）のアミノ酸配列を有し、かつ乳酸デヒドロゲナーゼ活性およびジアフォラーゼ活性を有することを特徴とする請求項1から4のいずれかに記載の酵素電極；

（a）配列番号69で表されるアミノ酸配列、

（b）配列番号69で表されるアミノ酸配列において、前記の各活性が損なわれない範囲で、1から複数個のアミノ酸の付加、欠失または置換の修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。

【手続補正7】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項13

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項13】

前記デヒドロゲナーゼとジアフォラーゼとの融合タンパク質が、以下の（a）または（b）のアミノ酸配列を有し、かつリンゴ酸デヒドロゲナーゼ活性およびジアフォラーゼ活性を有することを特徴とする請求項1から4のいずれかに記載の酵素電極；

（a）配列番号79で表されるアミノ酸配列、

（b）配列番号79で表されるアミノ酸配列において、前記の各活性が損なわれない範囲で、1から複数個のアミノ酸の付加、欠失または置換の修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。

【手続補正8】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項14

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項14】

前記デヒドロゲナーゼとジアフォラーゼとの融合タンパク質が、以下の（a）または（b）のアミノ酸配列を有し、かつリンゴ酸デヒドロゲナーゼ活性およびジアフォラーゼ活性を有することを特徴とする請求項1から4のいずれかに記載の酵素電極；

（a）配列番号88で表されるアミノ酸配列、

（b）配列番号88で表されるアミノ酸配列において、前記の各活性が損なわれない範囲で、1から複数個のアミノ酸の付加、欠失または置換の修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。

【手続補正9】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項15

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項15】

前記デヒドロゲナーゼとジアフォラーゼとの融合タンパク質が、以下の（a）または（b）のアミノ酸配列を有し、かつグルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性およびジアフォラーゼ活性を有することを特徴とする請求項1から4のいずれかに記載の酵素電極；

（a）配列番号97で表されるアミノ酸配列、

（b）配列番号97で表されるアミノ酸配列において、前記の各活性が損なわれない範囲で、1から複数個のアミノ酸の付加、欠失または置換の修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。

【手続補正10】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項16

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 16】

前記デヒドロゲナーゼとジアフォラーゼとの融合タンパク質が、以下の (a) または (b) のアミノ酸配列を有し、かつグルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性およびジアフォラーゼ活性を有することを特徴とする請求項 1 から 4 のいずれかに記載の酵素電極；

(a) 配列番号 106 で表されるアミノ酸配列、

(b) 配列番号 106 で表されるアミノ酸配列において、前記の各活性が損なわれない範囲で、1 から複数個のアミノ酸の付加、欠失 または置換 の修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。

【手続補正 11】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項 17

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 17】

前記アルコールデヒドロゲナーゼとアルデヒドデヒドロゲナーゼとの融合タンパク質が、以下の (a) または (b) のアミノ酸配列を有し、かつアルコールデヒドロゲナーゼ活性およびアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有する請求項 5 に記載の酵素電極；

(a) 配列番号 114 で表されるアミノ酸配列、

(b) 配列番号 114 で表されるアミノ酸配列において、前記の各活性が損なわれない範囲で、1 から複数個のアミノ酸の付加、欠失 または置換 の修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。

【手続補正 12】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項 18

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 18】

前記アルコールデヒドロゲナーゼとアルデヒドデヒドロゲナーゼとの融合タンパク質が、以下の (a) または (b) のアミノ酸配列を有し、かつアルコールデヒドロゲナーゼ活性およびアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有する請求項 5 に記載の酵素電極；

(a) 配列番号 121 で表されるアミノ酸配列、

(b) 配列番号 121 で表されるアミノ酸配列において、前記の各活性が損なわれない範囲で、1 から複数個のアミノ酸の付加、欠失 または置換 の修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。

【手続補正 13】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項 19

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 19】

前記イソメラーゼとグルコースデヒドロゲナーゼとの融合タンパク質が、以下の (a) または (b) のアミノ酸配列を有し、かつイソメラーゼ活性およびグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有する請求項 6 に記載の酵素電極；

(a) 配列番号 128 で表されるアミノ酸配列、

(b) 配列番号 128 で表されるアミノ酸配列において、前記の各活性が損なわれない範囲で、1 から複数個のアミノ酸の付加、欠失 または置換 の修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。

【手続補正 14】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項 2 0

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 2 0】

前記イソメラーゼとグルコースデヒドロゲナーゼとの融合タンパク質が、以下の (a) または (b) のアミノ酸配列を有し、かつイソメラーゼ活性およびグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有する請求項 6 に記載の酵素電極；

(a) 配列番号 1 3 5 で表されるアミノ酸配列、

(b) 配列番号 1 3 5 で表されるアミノ酸配列において、前記の各活性が損なわれない範囲で、1 から複数個のアミノ酸の付加、欠失または置換の修飾が単独あるいは複数の組合せで実施されているアミノ酸配列。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 9/02
C 1 2 N 15/00 A

(72)発明者 久保 亘

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

(72)発明者 矢野 哲哉

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA17 BA07 BA08 CA03 CA07 CA20 DA06 EA04 GA11
GA19 GA27 HA03

4B029 AA07 AA21 BB16 CC03 CC08 FA12 FA15

4B050 CC05 DD02 DD04 EE01 GG10 LL03 LL05 LL10