(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2025年5月22日(22.05.2025)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2025/105408 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 9/04 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) *C12N 15/53* (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) *C12Q 1/32* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2024/040387

(22) 国際出願日： 2024年11月13日(13.11.2024)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2023-194701 2023年11月15日(15.11.2023) JP

(71) 出願人: 天野エンザイム株式会社 (**AMANO ENZYME INC.**) [JP/JP]; 〒4608630 愛知県名古屋市中区錦１丁目２番７号 (JP).

(72) 発明者: 大野 篤 (**ONO, Atsushi**); 〒5090109 岐阜県各務原市テクノプラザー丁目６番 天野エンザイム株式会社 イノベーションセンター内 (JP).

(74) 代理人: 田中 順也, 外 (**TANAKA, Junya** et al.); 〒5300005 大阪府大阪市北区中之島６－２－４０ 中之島インテス２１階 (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT,

(54) **Title:** MODIFIED ENZYME

(54) 発明の名称： 改変型酵素

(57) **Abstract:** The purpose of the present invention is to provide an HBDH of which the enzymatic activity after being treated at least at one of prescribed temperatures in a temperature range of 40°C or higher is improved compared with the enzymatic activity of an enzyme comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 after being treated at the given temperature. Provided is a modified HBDH comprising an amino acid sequence having such a structure that a substitution with a specific amino acid residue is introduced into at least any one position selected from position-47, position-48, position-49, position-53, position-54, position-55, position-63, position-81, position-147, position-210, position-240, position-241, position-250, position-251 and position-252 in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1. The modified HBDH is improved in terms of HBDH activity after being treated at least at one of prescribed temperatures in a temperature range of 40 °C or higher compared with the HBDH activity of an enzyme comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 after being treated at the same temperature.

(57) 要約：本発明の目的は、４０℃以上の温度範囲における少なくともいずれかの所定温度で処理された後の酵素活性が、配列番号１に示すアミノ酸配列からなる酵素の前記所定温度で処理された後の酵素活性よりも向上するＨＢＤＨを提供することである。 配列番号１に示すアミノ酸配列において、第４７位、第４８位、第４９位、第５３位、第５４位、第５５位、第６３位、第８１位、第１４７位、第２１０位、第２４０位、第２４１位、第２５０位、第２５１位、及び第２５２位の少なくともいずれかに所定のアミノ酸残基への置換が導入されたアミノ酸配列からなる改変型ＨＢＤＨは、４０℃以上の温度範囲における少なくともいずれかの所定温度処理後のＨＢＤＨ活性が、配列番号１に示すアミノ酸配列からなる酵素の前記所定温度処理後のＨＢＤＨ活性よりも向上している。

WO 2025/105408 A1

［続葉有］

RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

一　国際調査報告（条約第21条(3)）

一　明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

明　細　書

発明の名称 ： 改変型酵素

技術分野

[0001]　本発明は、改変型酵素に関する。

背景技術

[0002]　Ｄ－３－ヒドロキシ酪酸脱水素酵素（ＨＢＤＨ：ＥＣ１．１．１．３０）は、短鎖型脱水素酵素／還元酵素（ＳＤＲ）ファミリーに属し、ＮＡＤ$^{+}$を補酵素として３－ヒドロキシ酪酸のアセト酢酸への酸化反応を可逆的に触媒する酵素である。ヒドロキシ酪酸は、アセト酢酸及びアセトンと共にケトン体と呼ばれる。

[0003]　血中ケトン体濃度の急激な上昇は、１型糖尿病の重度の合併症であるケトアシドーシス（ＤＫＡ）を引き起こす原因として知られている。従って、合併症予防のために、１型糖尿病患者のケトン体量をモニターすることが推奨される。ＨＢＤＨは、このようなケトン体測定に用いられる産業上重要な酵素である。

[0004]　ＨＢＤＨは様々な微生物から単離されている。例えば、特許文献１にはＲｈｏｄｏｂａｃｔｅｒ　ｓｐｈａｅｒｏｉｄｅｓ由来のＨＢＤＨが開示され、非特許文献１にはＰａｒａｃｏｃｃｕｓ　ｄｅｎｉｔｒｉｆｉｃａｎｓ由来のＨＢＤＨが開示され、非特許文献２にはＲａｌｓｔｏｎｉａ　ｐｉｃｋｅｔｔｉｉ　Ｔ１由来のＨＢＤＨが開示され、非特許文献３にはＭｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｐｈｌｅｉ　ＡＴＣＣ３５４由来のＨＢＤＨが開示され、非特許文献４にはＳｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ｘｙｌｏｓｕｓ由来のＨＢＤＨが開示され、非特許文献５にはＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｆｒａｇｉ由来のＨＢＤＨが開示され、非特許文献６にはＡｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ　ｆａｅｃａｌｉｓ由来のＨＢＤＨが開示され、非特許文献７にはＡｃｉｄｏｖｏｒａｘ　ｓｐ．　ｓｔｒａｉｎ　ＳＡ１由来のＨＢＤＨが開示され、非特許文献８にはＢａｃｉｌｌｕｓ　ｃｅｒｅｕｓ　Ｔ由来のＨＢＤＨが開示

され、非特許文献９にはＺｏｏｇｌｏｅａ　ｒａｍｉｇｅｒａ　Ｉ－１６－Ｍ由来のＨＢＤＨが開示されている。

[0005] 微生物由来のＨＢＤＨは熱に対して不安定であるが、特許文献２及び特許文献３には、それぞれ、アルカリゲネス・ファエカリス由来のＨＢＤＨ及びシュードモナス種由来のＨＢＤＨが、３７℃でも安定な熱安定性に優れたＨＢＤＨであることが開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開平１１－３１８４３８号公報

特許文献2：特開平８－７０８５６号公報

特許文献3：特開２００３－３３９３８５号公報

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Biochim. Biophys. Acta 871, 302-309 (1986)

非特許文献2：J. Biosci. Bioeng. 101, 501-507 (2006)

非特許文献3：J. Gen. Microbiol. 104, 123-126 (1978)

非特許文献4：Acta Microbiol. Pol. 43, 33-45 (1994)

非特許文献5：J. Mol. Biol. 355, 722-733 (2006)

非特許文献6：Acta Crystallogr. Sect. F 65, 331-335 (2009)

非特許文献7：J. Biosci. Bioeng. 97, 78-81 (2004)

非特許文献8：Can. J. Microbiol. 19, 673-677 (1973)

非特許文献9：J. Biochem. 89, 625-635 (1981)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] ＨＢＤＨの産業上の重要性に鑑みると、加熱条件で処理された後の活性が野生型よりも向上する耐熱性を備えるＨＢＤＨの創出が望まれる。

[0009] そこで本発明は、４０℃以上の温度範囲における少なくともいずれかの所定温度で処理された後の酵素活性が、野生型ＨＢＤＨの前記所定温度で処理

された後の酵素活性よりも向上するＨＢＤＨを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者は、ラルストニア・ピッケティ（Ｒａｌｓｔｏｎｉａ　ｐｉｃｋｅｔｔｉｉ）由来のＨＢＤＨを改変することで、加熱処理後の活性が高まるような耐熱性の付与を試みた。しかしながら、多くの変異体を作製しても、そのような耐熱性が備わる変異体はほとんど得ることができなかった。その中で、偶然にもわずかな変異体において、４０℃以上の温度範囲における少なくともいずれかの所定温度で処理された後の酵素活性が、野生型ＨＢＤＨの前記所定温度で処理された後の酵素活性よりも向上する耐熱性が備わることを見出した。即ち、本発明は、下記に掲げる態様の発明を提供する。

[0011] 項１． 以下の（I）～（III）のいずれかに示すポリペプチドからなる改変型酵素：

（I）配列番号１に示すアミノ酸配列において、

［Ａ］第４７位アミノ酸残基の、メチオニン残基への置換、

［Ｂ］第４８位アミノ酸残基の、ヒスチジン残基への置換、

［Ｃ］第４９位アミノ酸残基の、ロイシン残基への置換、

［Ｄ］第５３位アミノ酸残基の、フェニルアラニン残基、ロイシン残基、プロリン残基、又はグルタミン酸残基への置換、

［Ｅ］第５４位アミノ酸残基の、ロイシン残基、アラニン残基、又はフェニルアラニン残基への置換、

［Ｆ］第５５位アミノ酸残基の、グリシン残基、グルタミン酸残基、メチオニン残基、又はフェニルアラニン残基への置換、

［Ｇ］第６３位アミノ酸残基の、ロイシン残基への置換、

［Ｈ］第８１位アミノ酸残基の、イソロイシン残基への置換、

［Ｉ］第１４７位アミノ酸残基の、グリシン残基への置換、

［Ｊ］第２１０位アミノ酸残基の、バリン残基への置換、

［Ｋ］第２４０位アミノ酸残基の、アラニン残基への置換、

［Ｌ］第２４１位アミノ酸残基の、フェニルアラニン残基への置換、

［Ｍ］第２５０位アミノ酸残基の、バリン残基への置換、

［Ｎ］第２５１位アミノ酸残基の、プロリン残基への置換、及び

［Ｏ］第２５２位アミノ酸残基の、イソロイシン残基への置換

のうちの、少なくともいずれかの置換が導入されたアミノ酸配列からなるポリペプチド、

（II）前記［Ａ］～［Ｏ］の少なくともいずれかに示す置換が導入されたアミノ酸配列において、前記置換されたアミノ酸残基以外の１個又は数個のアミノ酸残基が置換、付加、挿入又は欠失されてなり、且つ、４０℃以上の温度範囲における少なくともいずれかの所定温度処理後の３－ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ活性が、配列番号１に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドの前記所定温度処理後の前記活性より向上しているポリペプチド、並びに

（III）前記［Ａ］～［Ｏ］の少なくともいずれかに示す置換が導入されたアミノ酸配列において、前記置換されたアミノ酸残基を除いた部分の配列同一性が７０％以上であり、且つ、４０℃以上の温度範囲における少なくともいずれかの所定温度処理後の３－ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ活性が、配列番号１に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドの前記所定温度処理後の前記活性より向上しているポリペプチド。

項２．　項１に記載の改変型酵素をコードしているＤＮＡ。

項３．　項２に記載のＤＮＡを含む発現カセット又は組換えベクター。

項４．　項３に記載の発現カセット又は組換えベクターを用いて宿主を形質転換して得られる形質転換体。

項５．　項４に記載の形質転換体を培養する工程を含む、改変型酵素の製造方法。

項６．　項１に記載の改変型酵素を含む酵素剤。

項７．　項１に記載の改変型酵素を含む、ケトン体測定用センサ。

項８．　項１に記載の改変型酵素を含む、ケトン体測定用キット。

項９．　項１に記載の改変型酵素活性条件下で、ケトン体を測定すべき試料

と、前記改変型酵素とを接触させる工程を含む、試料中のケトン体を測定する方法。

発明の効果

[0012] 本発明によれば、４０℃以上の温度範囲における少なくともいずれかの所定温度で処理された後の酵素活性が、野生型ＨＢＤＨの前記所定温度で処理された後の酵素活性よりも向上した改変型ＨＢＤＨが提供される。

発明を実施するための形態

[0013] 以下、本発明を詳細に説明する。なお、アミノ酸配列における２０種類のアミノ酸残基は、一文字略記で表現することがある。即ち、グリシン（Ｇｌｙ）はG、アラニン（Ａｌａ）はA、バリン（Ｖａｌ）はV、ロイシン（Ｌｅｕ）はL、イソロイシン（Ｉｌｅ）はＩ、フェニルアラニン（Ｐｈｅ）はF、チロシン（Ｔｙｒ）はY、トリプトファン（Ｔｒｐ）はW、セリン（Ｓｅｒ）はS、スレオニン（Ｔｈｒ）はT、システイン（Ｃｙｓ）はC、メチオニン（Ｍｅｔ）はM、アスパラギン酸（Ａｓｐ）はD、グルタミン酸（Ｇｌｕ）はE、アスパラギン（Ａｓｎ）はN、グルタミン（ＧＩｎ）はQ、リジン（Ｌｙｓ）はK、アルギニン（Ａｒｇ）はR、ヒスチジン（Ｈｉｓ）はH、プロリン（Ｐｒｏ）はＰである。

[0014] 本明細書において、「非極性アミノ酸」には、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、メチオニン、フェニルアラニン、及びトリプトファンが含まれる。「非電荷アミノ酸」には、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、及びグルタミンが含まれる。「酸性アミノ酸」には、アスパラギン酸及びグルタミン酸が含まれる。「塩基性アミノ酸」には、リジン、アルギニン、及びヒスチジンが含まれる。

[0015] 本明細書において、「置換」とは、人為的にアミノ酸残基の置換を導入した場合のみならず、自然にアミノ酸残基の置換が導入された場合、すなわち、もともとアミノ酸残基が相違していた場合も含まれる。本明細書においては、アミノ酸残基の置換は、人為的な置換であってもよく、自然な置換であってもよいが、人為的な置換が好ましい。

[0016] １．改変型３－ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ（改変型ＨＢＤＨ）

本発明の改変型酵素つまり改変型３－ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼは、以下の（I）から（III）のいずれかに示すポリペプチドからなる。

[0017] （I）配列番号１に示すアミノ酸配列において、

［Ａ］第４７位アミノ酸残基の、メチオニン残基への置換、

［Ｂ］第４８位アミノ酸残基の、ヒスチジン残基への置換、

［Ｃ］第４９位アミノ酸残基の、ロイシン残基への置換、

［Ｄ］第５３位アミノ酸残基の、フェニルアラニン残基、ロイシン残基、プロリン残基、又はグルタミン酸残基への置換、

［Ｅ］第５４位アミノ酸残基の、ロイシン残基、アラニン残基、又はフェニルアラニン残基への置換、

［Ｆ］第５５位アミノ酸残基の、グリシン残基、グルタミン酸残基、メチオニン残基、又はフェニルアラニン残基への置換、

［Ｇ］第６３位アミノ酸残基の、ロイシン残基への置換、

［Ｈ］第８１位アミノ酸残基の、イソロイシン残基への置換、

［Ｉ］第１４７位アミノ酸残基の、グリシン残基への置換、

［Ｊ］第２１０位アミノ酸残基の、バリン残基への置換、

［Ｋ］第２４０位アミノ酸残基の、アラニン残基への置換、

［Ｌ］第２４１位アミノ酸残基の、フェニルアラニン残基への置換、

［Ｍ］第２５０位アミノ酸残基の、バリン残基への置換、

［Ｎ］第２５１位アミノ酸残基の、プロリン残基への置換、及び

［Ｏ］第２５２位アミノ酸残基の、イソロイシン残基への置換

のうちの、少なくともいずれかの置換が導入されたアミノ酸配列からなるポリペプチド

（II）前記［Ａ］～［Ｏ］の少なくともいずれかに示す置換が導入されたアミノ酸配列において、前記置換されたアミノ酸残基以外の１個又は数個のアミノ酸残基が置換、付加、挿入又は欠失されてなり、且つ、４０℃以上の温度範囲における少なくともいずれかの所定温度処理後の３－ヒドロキシ酪

酸デヒドロゲナーゼ活性が、配列番号１に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドの前記所定温度処理後の当該活性より向上しているポリペプチド

（III）前記［Ａ］～［Ｏ］の少なくともいずれかに示す置換が導入されたアミノ酸配列において、前記置換されたアミノ酸残基を除いた部分の配列同一性が７０％以上であり、且つ、４０℃以上の温度範囲における少なくともいずれかの所定温度処理後の３－ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ活性が、配列番号１に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドの前記所定温度処理後の当該活性より向上しているポリペプチド

[0018] 配列番号１に示すアミノ酸配列は、ラルストニア・ピッケティ（Ｒａｌｓｔｏｎｉａ　ｐｉｃｋｅｔｔｉｉ）由来の野生型３－ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ（ＨＢＤＨ）のアミノ酸配列である。

[0019] 前記（I）～（III）のポリペプチドは、上記［Ａ］～［Ｏ］のいずれかの置換を単独で含むポリペプチド（ラルストニア・ピッケティ由来ＨＢＤＨの単独置換体）であってもよいし、２以上の組み合わせで含むポリペプチド（ラルストニア・ピッケティ由来ＨＢＤＨの多重置換体）であってもよい。

[0020] 前記（I）～（III）のポリペプチドの中でも、好ましい例として、前記［Ａ］～［Ｏ］の少なくともいずれかの置換のうち、表１の「置換の種類」の列に示す置換を含むポリペプチドが挙げられる。表１において、それぞれの好ましい置換は、「置換の略称」の列に示す通り、アミノ酸残基位置と置換後のアミノ酸残基とで表記する場合がある。それぞれの好ましい置換を有する場合の（I）のポリペプチドの具体的な配列を、表１の「（I）のポリペプチドの配列」の列に示す。

[0021]

[表1]

置換の種類	置換の略称	(I)のポリペプチドの配列
[A],[B]及び[C]の置換	47M/48H/49L	配列番号２
[D],[E]及び[F]の置換	53F/54L/55G	配列番号３
	53L/54L/55E	配列番号４
	53P/54A/55M	配列番号５
	53E/54F/55F	配列番号６
[G]の置換	63L	配列番号７
[H]の置換(81I)	81I	配列番号８
[I]の置換(147G)	147G	配列番号９
[J]の置換(210V)	210V	配列番号10
[K]及び[L]の置換	240A/241F	配列番号11
[M],[N]及び[O]の置換	250V/251P/252I	配列番号12

[0022] 前記（II）のポリペプチドにおいて、導入されるアミノ酸の改変は、置換、付加、挿入、及び欠失の中から１種類の改変のみ（例えば置換のみ）を含むものであってもよく、２種以上の改変（例えば、置換と挿入）を含んでいてもよい。前記（II）のポリペプチドにおいて、前記［Ａ］～［Ｏ］の少なくともいずれかに示す置換が導入されたアミノ酸残基以外の部分におけるアミノ酸の相違の数は、１個又は数個であればよく、例えば１～７７個、１～６０個、１～５０個、１～４０個、又は１～３０個、好ましくは１～２５個、１～２０個、１～１５個、より好ましくは１～１０個、さらに好ましくは１～８個、１～７個、１～６個、１～５個、又は１～４個、一層好ましくは１～３個、特に好ましくは１又は２個若しくは１個が挙げられる。

[0023] また、前記（III）のポリペプチドにおいて、前記［Ａ］～［Ｏ］の少なくともいずれかに示す置換が導入されたアミノ酸残基以外の部分におけるアミノ酸の配列同一性は、配列番号１に示すアミノ酸配列の対応する部分に対して７０％以上であればよいが、好ましくは８０％以上、より好ましくは８５％以上、さらに好ましくは９０％以上、一層好ましくは９５％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上、特に好ましくは９９％以上又は９９．５％

以上が挙げられる。

[0024] ここで、前記（III）のポリペプチドにおいて、「配列同一性」とは、ＢＬＡＳＴＰＡＣＫＡＧＥ［ｓｇｉ３２ ｂｉｔ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｖｅｒｓｉｏｎ ２．０．１２；ａｖａｉｌａｂｌｅ ｆｒｏｍ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ（ＮＣＢＩ）］のｂｌ２ｓｅｑ ｐｒｏｇｒａｍ（Ｔａｔｉａｎａ Ａ．Ｔａｔｕｓｏｖａ，Ｔｈｏｍａｓ Ｌ．Ｍａｄｄｅｎ，ＦＥＭＳ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｌｅｔｔ．，Ｖｏｌ．１７４，ｐ２４７－２５０，１９９９）により得られるアミノ酸配列の同一性の値を示す。パラメーターは、Ｇａｐ ｉｎｓｅｒｔｉｏｎ Ｃｏｓｔ ｖａｌｕｅ：１１、Ｇａｐ ｅｘｔｅｎｓｉｏｎ Ｃｏｓｔ ｖａｌｕｅ：１に設定すればよい。

[0025] 前記（II）及び（III）のポリペプチドにおいて、配列番号１に示すアミノ酸配列における第１６位（Ｉ）、第１５４位（Ｙ）、第１５８位（Ｋ）、第１８４位（Ｐ）、第１８７位（Ｖ）、及び第１８９位（Ｔ）のアミノ酸は、ＮＡＤ（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド）の結合に寄与していると考えられ、第９３位（Ｑ）、第１４１位（Ｓ）、第１４３位（Ｈ）、第１５１位（Ｋ）、及び第１５４位（Ｙ）のアミノ酸は、基質の結合に寄与していると考えられ、いずれも３－ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ活性に寄与していると考えられることから、これらの部位には置換又は欠失を導入しないことが望ましい。

[0026] 前記（II）及び（III）のポリペプチドにおいて、前記［Ａ］～［Ｏ］の少なくともいずれかに示す置換が導入されたアミノ酸残基以外の部分に対してアミノ酸置換が導入されている場合、導入されるアミノ酸置換の好適な一態様として保存的置換が挙げられる。即ち、前記（II）及び（III）のポリペプチドにおける保存的置換としては、例えば、置換前のアミノ酸が非極性アミノ酸であれば他の非極性アミノ酸への置換、置換前のアミノ酸が非荷電性アミノ酸であれば他の非荷電性アミノ酸への置換、置換前のアミノ酸が酸性アミノ酸であれば他の酸性アミノ酸への置換、及び置換前のアミノ酸が塩基性

アミノ酸であれば他の塩基性アミノ酸への置換が挙げられる。

[0027] 前記（II）及び（III）のポリペプチドが有する「配列番号１に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドの耐熱性より向上している」耐熱性とは、４０℃以上の温度範囲における少なくともいずれかの所定温度で処理された後のＨＢＤＨ活性が、配列番号１に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドの前記所定温度で処理された後のＨＢＤＨ活性よりも高い温度特性をいう。前記（II）及び（III）のポリペプチドが有する向上した耐熱性は、４０℃以上の温度範囲における少なくともいずれかの所定温度（当該所定温度に供される時間は１５分とする。）で認められればよいが、当該温度範囲としては、好ましくは４５℃以上が挙げられる。配列番号１に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドは、特に５０℃以上で耐熱性が顕著に悪化するため、当該温度範囲としては、より好ましくは５０℃以上が挙げられる。当該温度範囲の上限については特に限定されないが、例えば６０℃以下、好ましくは５５℃以下が挙げられる。当該温度範囲の具体例としては、具体的な範囲としては、４０～６０℃、４５～６０℃、５０～６０℃、又は５０～５５℃が挙げられる。

[0028] ２．ＤＮＡ

本発明のＤＮＡは、上記「１．改変型３－ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ（改変型ＨＢＤＨ）」をコードするＤＮＡである。

[0029] 本発明のＤＮＡは、上記「１．改変型３－ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ（改変型ＨＢＤＨ）」で述べた（I）～（III）に示すポリペプチドからなる改変型ＨＢＤＨをコードする塩基配列を有するＤＮＡであれば特に限定されない。（I）～（III）に示すポリペプチドの基準配列である配列番号１に示すアミノ酸配列（ラルストニア・ピッケティ由来の野生型ＨＢＤＨ）をコードするＤＮＡの塩基配列としては、配列番号１３が挙げられる。従って、本発明のＤＮＡは、配列番号１３を基準配列として当業者が適宜設計することができる。

[0030] 本発明のＤＮＡの例として、以下の（i）～（iii）のいずれかに示すＤＮ

Ａが挙げられる。

[0031] （ｉ）配列番号１３に示す塩基配列において、下記表に示す［ａ］～［ｏ］の少なくともいずれかの置換が導入された塩基配列からなるＤＮＡ

［ａ］第１３９～１４１位の、メチオニン残基をコードする塩基配列への置換、

［ｂ］第１４２～１４４位アミノ酸残基の、ヒスチジン残基をコードする塩基配列への置換、

［ｃ］第１４５～１４７位アミノ酸残基の、ロイシン残基をコードする塩基配列への置換、

［ｄ］第１５７～１５９位アミノ酸残基の、フェニルアラニン残基、ロイシン残基、プロリン残基、又はグルタミン酸残基をコードする塩基配列への置換、

［ｅ］第１６０～１６２位アミノ酸残基の、ロイシン残基、アラニン残基、又はフェニルアラニン残基をコードする塩基配列への置換、

［ｆ］第１６３～１６５位アミノ酸残基の、グリシン残基、グルタミン酸残基、メチオニン残基、又はフェニルアラニン残基をコードする塩基配列への置換、

［ｇ］第１８７～１８９位アミノ酸残基の、ロイシン残基をコードする塩基配列への置換、

［ｈ］第２４１～２４３位アミノ酸残基の、イソロイシン残基をコードする塩基配列への置換、

［ｉ］第４３９～４４１位アミノ酸残基の、グリシン残基をコードする塩基配列への置換、

［ｊ］第６２８～６３０位アミノ酸残基の、バリン残基をコードする塩基配列への置換、

［ｋ］第７１８～７２０位アミノ酸残基の、アラニン残基をコードする塩基配列への置換、

［ｌ］第７２１～７２３位アミノ酸残基の、フェニルアラニン残基を

コードする塩基配列への置換、

［ｍ］第７４８～７５０位アミノ酸残基の、バリン残基をコードする塩基配列への置換、

［ｎ］第７５１～７５３位アミノ酸残基の、プロリン残基をコードする塩基配列への置換、及び

［ｏ］第７５４～７５６位アミノ酸残基の、イソロイシン残基をコードする塩基配列への置換

（ｉｉ）配列番号１に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドより耐熱性が向上しているポリペプチドをコードするＤＮＡであって、上記（ｉ）に示すＤＮＡと相補的な塩基配列からなるＤＮＡとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡ

（ｉｉｉ）配列番号１に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドより耐熱性が向上しているポリペプチドをコードするＤＮＡであって、上記（ｉ）に示すＤＮＡと７０％以上の相同性を有するＤＮＡ

[0032] 前記（ｉ）のＤＮＡの具体例は、配列番号１３の塩基配列に基づいて当業者により容易に決定される。表１の配列番号２～１２に示すポリペプチドをコードするＤＮＡの具体的な塩基配列としては、それぞれ、配列番号１４～２４の塩基配列が挙げられる。

[0033] 前記（ｉｉ）のＤＮＡについて、「ストリンジェントな条件下」とは、０．５％ＳＤＳ、５×デンハルツ〔Ｄｅｎｈａｒｔｚ’ｓ、０．１％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）、０．１％ポリビニルピロリドン、０．１％フィコール４００〕および１００μｇ／ｍｌサケ精子ＤＮＡを含む６×ＳＳＣ（１×ＳＳＣは、０．１５Ｍ ＮａＣｌ、０．０１５Ｍクエン酸ナトリウム、ｐＨ７．０）中で、５０℃～６５℃で４時間～一晩保温する条件をいう。

[0034] ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーションは、具体的には、以下の手法によって行われる。即ち、ＤＮＡライブラリー又はｃＤＮＡライブラリーを固定化したナイロン膜を作成し、６×ＳＳＣ、０．５％ ＳＤＳ、５×デンハルツ、１００μｇ／ｍｌサケ精子ＤＮＡを含むプレハイブリダイ

ゼーション溶液中、６５℃でナイロン膜をブロッキングする。その後、^{32}Ｐでラベルした各プローブを加えて、６５℃で一晩保温する。このナイロン膜を６×ＳＳＣ中、室温で１０分間、０．１％ＳＤＳを含む２×ＳＳＣ中、室温で１０分間、０．１％ＳＤＳを含む０．２×ＳＳＣ中、４５℃で３０分間洗浄した後、オートラジオグラフィーをとり、プローブと特異的にハイブリダイズしているＤＮＡを検出することができる。

[0035] 前記（iii）のＤＮＡについて、当該相同性としては、７０％以上であればよいが、好ましくは８０％以上、又は８５％以上、より好ましくは９０％以上、又は９３％以上、さらに好ましくは９５％以上、一層好ましくは９８％以上、より一層好ましくは９８．５％以上、又は９９％以上、特に好ましくは９９．３％以上、又は９９．５％以上が挙げられる。

[0036] ここで、ＤＮＡの「相同性」は、基準配列を照会配列として比較するアルゴリズムをもった公開又は市販されているソフトウェアを用いて計算される。具体的には、ＢＬＡＳＴ、ＦＡＳＴＡ、又はＧＥＮＥＴＹＸ（株式会社ゼネティックス製）等を用いることができ、これらはデフォルトパラメーターに設定して使用すればよい。

[0037] 本発明のＤＮＡは、例えば、配列番号１に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド（ラルストニア・ピッケティ由来の野生型ＨＢＤＨ）をコードしているＤＮＡに、上記［ａ］～［ｏ］の少なくともいずれかの置換を導入することにより得ることができる。また、本発明のＤＮＡは、遺伝子の全合成法によって人工合成することもできる。

[0038] 配列番号１に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードしているＤＮＡについては、配列番号１３に示される塩基配列が組み込まれたプラスミド等の核酸構築物からＰＣＲを用いた常法により当該塩基配列部分を取得することができる。

[0039] 遺伝子に変異を導入し、人為的にアミノ酸配列を改変する方法としては、Ｋｕｎｋｅｌ法やＧａｐｐｅｄ ｄｕｐｌｅｘ法等の公知の手法、及び部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入キット、例えば、ＱｕｉｋＣｈａｎ

ｇｅ™Ｓｉｔｅ－Ｄｉｒｅｃｔｅｄ Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ Ｋｉｔ（ストラタジーン社）、ＧｅｎｅＴａｉｌｏｒ™Ｓｉｔｅ－Ｄｉｒｅｃｔｅｄ Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ Ｓｙｓｔｅｍ（インビトロジェン社）、ＴａＫａＲａ Ｓｉｔｅ－Ｄｉｒｅｃｔｅｄ Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ Ｓｙｓｔｅｍ（Ｍｕｔａｎ－Ｋ，Ｍｕｔａｎ－Ｓｕｐｅｒ Ｅｘｐｒｅｓｓ Ｋｍ等：タカラバイオ社）等を用いることができる。

[0040] 本発明のＤＮＡには、コドンの縮重に由来する多種のＤＮＡが包含される。同じアミノ酸配列をコードする多種のＤＮＡを人為的に作製することは、公知の遺伝子工学的手法を用いて容易に行うことができる。例えば、遺伝子工学的なタンパク質の生産において、目的のタンパク質をコードする本来の遺伝子上で使用されているコドンが宿主中では使用頻度の低いものであった場合には、タンパク質の発現量が低いことがある。このような場合にはコードされているアミノ酸配列に変化を与えることなく、コドン利用頻度を宿主に最適化することにより、目的タンパク質の高発現を図ることができる。

[0041] コドン利用頻度を表す指標として、各コドンの宿主最適コドン利用頻度の総計を採択すればよい。最適コドンとは、同じアミノ酸に対応するコドンのうち利用頻度が最も高いコドンと定義される。コドン利用頻度は、宿主に最適化したものであれば特に限定されないが、例えば、大腸菌の最適コドンの一例として以下のものが挙げられる。Ｆ：フェニルアラニン（ｔｔｔ）、Ｌ：ロイシン（ｃｔｇ）、Ｉ：イソロイシン（ａｔｔ）、Ｍ：メチオニン（ａｔｇ）、Ｖ：バリン（ｇｔｇ）、Ｙ：チロシン（ｔａｔ）、終止コドン（ｔａａ）、Ｈ：ヒスチジン（ｃａｔ）、Ｑ：グルタミン（ｃａｇ）、Ｎ：アスパラギン（ａａｔ）、Ｋ：リジン（ａａａ）、Ｄ：アスパラギン酸（ｇａｔ）、Ｅ：グルタミン酸（ｇａａ）、Ｓ：セリン（ａｇｃ）、Ｐ：プロリン（ｃｃｇ）、Ｔ：トレオニン（ａｃｃ）、Ａ：アラニン（ｇｃｇ）、Ｃ：システイン（ｔｇｃ）、Ｗ：トリプトファン（ｔｇｇ）、Ｒ：アルギニン（ｃｇｃ）、Ｇ：グリシン（ｇｇｃ）。

[0042] 塩基配列に変異を導入したＤＮＡの塩基配列の確認は、慣用の方法により

配列決定することにより行うことができる。具体的な配列決定法としては、ジデオキシヌクレオチドチェーンターミネーション法（Ｓａｎｇｅｒ ｅｔａｌ．（１９７７） Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７４：５４６３）、又は適当なＤＮＡシークエンサーを利用した配列解析法等が挙げられる。また、ＤＮＡが目的のポリペプチドをコードするＤＮＡであるかどうかの確認方法としては、決定された塩基配列を配列番号１３に示す塩基配列等の無置換塩基配列と比較する方法、又は、決定された塩基配列より推定されるアミノ酸配列を配列番号１に示すアミノ酸配列等の無置換アミノ酸配列と比較する方法が挙げられる。

[0043] ３．発現カセット又は組換えベクター

本発明の発現カセット又は組換えベクターは、上記「２．ＤＮＡ」に記載の本発明のＤＮＡを含む。本発明の発現カセット又は組換えベクターは、本発明のＤＮＡにプロモーター及びターミネーターを連結することにより、又は、発現ベクターに本発明の発現カセット又は本発明のＤＮＡを挿入することにより得ることができる。

[0044] 本発明の発現カセット又は本発明の組換えベクターには、制御因子として、プロモーター及びターミネーターの他、更に必要に応じてエンハンサー、ＣＣＡＡＴボックス、ＴＡＴＡボックス、ＳＰＩ部位等の転写要素が含まれていてもよい。これらの制御因子は、本発明のＤＮＡに作動可能に連結されていればよい。作動可能に連結とは、本発明のＤＮＡを調節する種々の制御因子と本発明のＤＮＡが、宿主細胞中で作動し得る状態で連結されることをいう。

[0045] 本発明の組換えベクターについて、発現ベクターとしては、宿主内で自律的に増殖し得るファージ、プラスミド、又はウイルスから遺伝子組換え用として構築されたものが好適である。このような発現ベクターは公知であり、例えば、商業的に入手可能な発現ベクターとしては、ｐＱＥ系ベクター（株式会社キアゲン）、ｐＴｒｃ９９Ａ、ｐＤＲ５４０、ｐＲＩＴ２Ｔ（ＧＥヘルスケアバイオサイエンス株式会社）、ｐＥＴ系ベクター（メルク株式会社

）等が挙げられる。発現ベクターは、宿主細胞との適切な組み合わせを選んで使用すればよく、例えば、大腸菌を宿主細胞とする場合には、ｐＥＴ系ベクターとＤＨ５α大腸菌株の組み合わせ、ｐＥＴ系ベクターとＢＬ２１（ＤＥ３）大腸菌株の組み合わせ、又はｐＤＲ５４０ベクターとＪＭ１０９大腸菌株の組み合わせ等が挙げられる。

[0046] ４．形質転換体

本発明の形質転換体は、上記「３．発現カセット又は組換えベクター」に記載の本発明の発現カセット又は組換えベクターにより宿主を形質転換して得られるものである。

[0047] 本発明の形質転換体の製造に使用される宿主としては、遺伝子の導入が可能で、発現カセット又は組換えベクターが安定であり、且つ自律増殖可能で本発明のＤＮＡを含む遺伝子の形質を発現できるのであれば特に制限されないが、例えば、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）等のエッシェリヒア属、バチルス・ズブチリス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ）等のバチルス属、シュードモナス・プチダ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓｐｕｔｉｄａ）等のシュードモナス属、クリセオバクテリウム・プロテオリティカム（Ｃｈｒｙｓｅｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｐｒｏｔｅｏｌｙｔｉｃｕｍ）等のクリセオバクテリウム属等に属する細菌、；酵母等が好適な例として挙げられるが、その他、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等であってもよい。

[0048] 本発明の形質転換体は、宿主に本発明の発現カセット又は本発明の組換えベクターを導入することによって得ることができる。本発明のＤＮＡを導入する場所も、目的の遺伝子が発現できる限り特に限定されず、プラスミド上であってもよいし、ゲノム上であってもよい。本発明の発現カセット又は本発明の組換えベクターを導入する具体的な方法としては、例えば、組換えベクター法、ゲノム編集法が挙げられる。宿主に発現カセット又は組換えベクターを導入する条件は、宿主の種類等に応じて適宜設定すればよい。宿主が細菌の場合であれば、例えば、カルシウムイオン処理によるコンピテントセルを用いる方法及びエレクトロポレーション法等が挙げられる。宿主が酵母

の場合であれば、例えば、電気穿孔法（エレクトロポレーション法）、スフェロプラスト法及び酢酸リチウム法等が挙げられる。宿主が動物細胞の場合であれば、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法及びリポフェクション法等が挙げられる。宿主が昆虫細胞の場合であれば、例えば、リン酸カルシウム法、リポフェクション法及びエレクトロポレーション法等が挙げられる。宿主が植物細胞の場合であれば、例えば、エレクトロポレーション法、アグロバクテリウム法、パーティクルガン法、及びＰＥＧ法等が挙げられる。

[0049] 本発明の発現カセット又は本発明の組換えベクターが宿主に組み込まれたか否かの確認は、ＰＣＲ法、サザンハイブリダイゼーション法、及びノーザンハイブリダイゼーション法等により行うことができる。

[0050] ＰＣＲ法よって本発明の発現カセット又は本発明の組換えベクターが宿主に組み込まれたか否かを確認する場合、例えば、形質転換体からゲノムＤＮＡ又は発現カセット又は組換えベクターを分離・精製すればよい。

[0051] 発現カセット又は組換えベクターの分離・精製は、例えば、宿主が細菌の場合、細菌を溶菌して得られる溶菌物に基づいて行われる。溶菌の方法としては、例えばリゾチームなどの溶菌酵素により処理が施され、必要に応じてプロテアーゼ、及び他の酵素並びにラウリル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）等の界面活性剤が併用される。

[0052] 更に、凍結融解およびフレンチプレス処理のような物理的破砕方法を組み合わせてもよい。溶菌物からのＤＮＡの分離・精製は、例えば、フェノール処理およびプロテアーゼ処理による除蛋白処理、リボヌクレアーゼ処理、アルコール沈殿処理並びに市販のキットを適宜組み合わせることにより行うことができる。

[0053] ＤＮＡの切断は、常法に従い、例えば制限酵素処理を用いて行うことができる。制限酵素としては、例えば特定のヌクレオチド配列に作用するII型制限酵素を用いる。ＤＮＡと発現カセット又は発現ベクターとの結合は、例えばＤＮＡリガーゼを用いて行う。

[0054] その後、分離・精製したＤＮＡを鋳型として、本発明のＤＮＡに特異的なプライマーを設計してＰＣＲを行う。ＰＣＲにより得られた増幅産物についてアガロースゲル電気泳動、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動等を行い、臭化エチジウムおよびＳＹＢＲ Ｇｒｅｅｎ液等により染色し、そして増幅産物をバンドとして検出することにより、形質転換されたことを確認することができる。

[0055] また、予め蛍光色素等により標識したプライマーを用いてＰＣＲを行い、増幅産物を検出することもできる。さらに、マイクロプレート等の固相に増幅産物を結合させ、蛍光および酵素反応等により増幅産物を確認する方法も採用してもよい。

[0056] ５．改変型３－ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ（改変型ＨＢＤＨ）の製造方法

本発明の改変型３－ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼの製造方法は、上記「１．改変型３－ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ（改変型ＨＢＤＨ）」に記載の酵素を製造する方法であって、本発明の形質転換体を培養する工程を含む。なお、改変型ＨＢＤＨに含まれる［Ａ］～［Ｏ］のいずれかに示す置換が自然に導入されているものである場合は、改変型ＨＢＤＨを産生する微生物を培養する工程を含む製造方法によって、改変型ＨＢＤＨを得ることができる。

[0057] 上記の培養条件は、上記形質転換体又は上記微生物の栄養生理的性質を考慮して適宜設定すればよいが、好ましくは液体培養が挙げられる。また、工業的製造を行う場合であれば、通気攪拌培養が好ましい。培地の栄養源としては、上記形質転換体又は上記微生物の生育に必要とされるものが使用され得る。炭素源としては、資化可能な炭素化合物であればよく、例えば、グルコース、スクロース、ラクトース、マルトース、糖蜜、ピルビン酸等が挙げられる。窒素源としては、資化可能な窒素化合物であればよく、例えば、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕アルカリ抽出物が挙げられる。炭素源及び窒素源の他に、例えば、リン酸塩、炭酸塩、硫

酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガンおよび亜鉛などの塩類、特定のアミノ酸並びに特定のビタミンなどを必要に応じて使用してもよい。

[0058] 培養温度は、本発明の上記形質転換体又は上記微生物が生育可能であり、且つ上記形質転換体又は上記微生物が改変型ＨＢＤＨを産生する範囲で適宜設定し得るが、好ましくは１５～４５℃程度、より好ましくは２５～３９℃程度である。培養は、改変型ＨＢＤＨが最高収量に達する時期を見計らって適当時期に完了すればよく、通常は培養時間が１２～４８時間程度が挙げられる。

[0059] 上記形質転換体又は上記微生物の培養後は、培養液を遠心分離などの分離方法に供することで、培養上清及び／又は菌体を回収できる。菌体には、超音波やフレンチプレスといった機械的方法又はリゾチーム等の溶菌酵素による処理を施し、必要に応じてプロテアーゼ等の酵素やラウリル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）等の界面活性剤を使用することにより可溶化し、所定の改変型ＨＢＤＨを含む水溶性画分を得ることができる。また、適当な発現カセット又は発現ベクターと宿主を選択することにより、発現した改変型ＨＢＤＨを培養液中に分泌させることもできる。

[0060] 上記のようにして得られた改変型ＨＢＤＨを含む水溶性画分は、そのまま精製処理に供してもよいし、該水溶性画分中の改変型ＨＢＤＨを濃縮した後に精製処理に供してもよい。濃縮は、例えば、減圧濃縮、膜濃縮、塩析処理、親水性有機溶媒（例えば、メタノール、エタノール及び／又はアセトン）による分別沈殿法等により行うことができる。

[0061] 改変型ＨＢＤＨの精製処理は、例えば、ゲルろ過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等の方法を適宜組み合わせることによって行うことができる。精製された改変型ＨＢＤＨは、必要に応じて、凍結乾燥、真空乾燥、スプレードライ等により粉末化してもよい。

[0062] ６．酵素剤

改変型ＨＢＤＨは、酵素剤の形態で提供されることができる。したがって、本発明は、上記「１．改変型３－ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ（改変型ＨＢＤＨ）」に記載の改変型ＨＢＤＨを有効成分として含む酵素剤も提供する。

[0063] 本発明の酵素剤における改変型ＨＢＤＨの含有量としては、酵素剤の使用時に有効成分の改変型ＨＢＤＨの活性が発揮される範囲であれば特に限定されない。

[0064] 本発明の酵素剤は、改変型ＨＢＤＨ以外に、本発明の効果が得られる限度で、他の成分を含んでいてもよいし、含んでいなくてもよい。他の成分としては、改変型ＨＢＤＨ以外の他の酵素、添加剤、上記製造方法で生じた培養残渣等が挙げられる。

[0065] 他の酵素としては、例えば、アミラーゼ（α－アミラーゼ、β－アミラーゼ、グルコアミラーゼ）、グルコシダーゼ（α－グルコシダーゼ、β－グルコシダーゼ）、ガラクトシダーゼ（α－ガラクトシダーゼ、β－ガラクトシダーゼ）、プロテアーゼ（酸性プロテアーゼ、中性プロテアーゼ、アルカリプロテアーゼ）、ペプチダーゼ（ロイシンペプチダーゼ、アミノペプチダーゼ）、リパーゼ、エステラーゼ、セルラーゼ、ホスファターゼ（酸性ホスファターゼ、アルカリホスファターゼ）、ヌクレアーゼ、デアミナーゼ、オキシダーゼ、デヒドロゲナーゼ（上記改変型ＨＢＤＨ以外）、グルタミナーゼ、ペクチナーゼ、カタラーゼ、デキストラナーゼ、トランスグルタミナーゼ、タンパク質脱アミド酵素、プルラナーゼ等が挙げられる。これらの他の酵素は、１種を単独で含んでもよいし、複数種の組み合わせで含んでもよい。

[0066] 添加剤としては、賦形剤、緩衝剤、懸濁剤、安定剤、保存剤、防腐剤、生理食塩水等が挙げられる。賦形剤としては、デンプン、デキストリン、マルトース、トレハロース、乳糖、Ｄ－グルコース、ソルビトール、Ｄ－マンニトール、白糖、グリセロール等が挙げられる。緩衝剤としては、リン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩等が挙げられる。安定剤としては、プロピレングリコール、アスコルビン酸等が挙げられる。保存剤としては、フェノール、塩化ベ

ンザルコニウム、ベンジルアルコール、クロロブタノール、メチルパラベン等が挙げられる。防腐剤としては、エタノール、塩化ベンザルコニウム、パラオキシ安息香酸、クロロブタノール等が挙げられる。これらの添加剤は、１種を単独で含んでもよいし、複数種の組み合わせで含んでもよい。

[0067] 培養残渣としては、培地由来の成分、夾雑タンパク質、菌体成分等が挙げられる。

[0068] 本発明の酵素剤の形態としては特に限定されず、例えば、液状、固形状（粉末、顆粒等）等が挙げられる。前記形態の酵素剤は、一般的に公知の方法で調製することができる。

[0069] 本発明の酵素剤の用途については、一般的にＨＢＤＨの活性を利用する用途であれば特に限定されない。好ましい用途としては、ケトン体測定が挙げられる。この用途において、測定目的となるケトン体は、３－ヒドロキシ酪酸（Ｒ－３－ヒドロキシ酪酸）である。ケトン体測定については、「９．試料中のケトン体を測定する方法」で詳述する。

[0070] ７．ケトン体測定用センサ

改変型ＨＢＤＨは、ケトン体測定用センサにおけるセンシング手段として用いることができる。従って、本発明は、上記「１．改変型３－ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ（改変型ＨＢＤＨ）」に記載の改変型ＨＢＤＨを含むケトン体測定用センサも提供する。

[0071] 本発明のケトン体測定用センサは、上記の改変型ＨＢＤＨを含むとともに、改変型ＨＢＤＨによる３－ヒドロキシ酪酸（Ｒ－３－ヒドロキシ酪酸）とＮＡＤ$^+$（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド）及び／又はその誘導体との反応に基づく変化及びその量を読み取り可能な信号に変換する物体として構成することができる。

[0072] 上記の改変型ＨＢＤＨによる３－ヒドロキシ酪酸（Ｒ－３－ヒドロキシ酪酸）とＮＡＤ$^+$及び／又はその誘導体との反応に基づく変化としては、具体的には、３－ヒドロキシ酪酸の消費、ＮＡＤ$^+$及び／又はその誘導体の酸化還元状態の変化が挙げられる。

[0073] 上記の改変型ＨＢＤＨによる３－ヒドロキシ酪酸（Ｒ－３－ヒドロキシ酪酸）とＮＡＤ+及び／又はその誘導体との反応に基づく変化及びその量を読み取り可能な信号としては、電気化学的信号及び光学的信号が挙げられる。

[0074] 電気化学的信号としては、化学的な状態（例えば、３－ヒドロキシ酪酸の存在等）が電気的な信号（例えば、電流等）に変換されたものが挙げられる。光学的信号としては、ＮＡＤ+及び／又はその誘導体酸化還元状態（例えば、ＮＡＤ+及び／又はその誘導体、並びに／若しくは、ＮＡＤＨ及び／又はその誘導体の存在）に基づく吸光及び／又は発光が挙げられる。

[0075] 本発明のケトン体測定用センサにおいて、上記の改変型ＨＢＤＨは、不溶性支持体に固定されていることが好ましい。改変型ＨＢＤＨの固定態様としては特に限定されず、付着、吸着、吸収、膨潤等による物理的固定、特異的非共有的結合による化学的又は生化学的固定、及び共有結合による化学的固定が挙げられる。

[0076] また、改変型ＨＢＤＨは、改変型ＨＢＤＨが単独で不溶性支持体に固定されていてもよいし、改変型ＨＢＤＨが他の成分とともに組成物の形態で不溶性支持体に固定されていてもよい。改変型ＨＢＤＨが組成物の形態で不溶性支持体に固定されている場合の具体的な態様としては、当該組成物が不溶性支持体に物理的固定（好ましくは付着により固定）している態様が挙げられる。

[0077] 不溶性支持体は、少なくともその表面が、上記の改変型ＨＢＤＨと３－ヒドロキシ酪酸との反応系中に溶解せず且つ上記の改変型ＨＢＤＨを固定できる固体又は固形の材料で構成されている。不溶性支持体の少なくとも表面を構成する材料の具体例としては、膨潤性材料（例えばゼラチン等）、多孔性基材（例えばセルロース、ろ紙等）、樹脂、ガラス、レドックスポリマー（つまり、レドックスメディエータを結合させたポリマー）、金属、カーボン等が挙げられる。

[0078] 不溶性担体の形状としては特に限定されず、例えば、基板状、薄片状、スティック状、ビーズ状等が挙げられる。

[0079] 上記の不溶性担体の好ましい例としては、その表面が上記の材料で構成された電極が挙げられる。また、このような電極には、好ましくは改変型ＨＢＤＨが物理的固定されており、より好ましくは、改変型ＨＢＤＨを含む組成物が物理的固定（好ましくは付着により固定）されている。

[0080] 本発明のケトン体測定用センサの具体的な態様としては、バイオセンサとして採用されている任意の形態であってよく、例えば、センサチップ、マイクロタイタープレート、テストストリップ、電気化学的フローセル等が挙げられる。

[0081] ８．ケトン体測定用キット

本発明のケトン体測定用キットは、上記「６．酵素剤」に記載の酵素剤のうちケトン体測定用途で用いられるもの（以下において、「ケトン体測定用酵素剤」とも記載する。）又は上記「７．ケトン体測定用センサ」に記載のケトン体測定用センサを含む。

[0082] 本発明のケトン体測定用キットは、ケトン体測定用酵素剤又はケトン体測定用センサの他、測定及び／又は試料の採取に用いられる適当な他のアイテムを更に含むことができる。

[0083] このような他のアイテムの例としては、補酵素、還元系試薬、レドックスメディエータ、緩衝液、蛍光プローブ、除タンパク質液、ランセットデバイス等が挙げられる。本発明のケトン体測定用キットは、これらの他のアイテムとして、１種を単独で含んでいてもよいし、複数種の組み合わせで含んでいてもよい。

[0084] 補酵素としては、例えば、ＮＡＤ$^+$（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド）、ＮＡＤ$^+$誘導体（例えば、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスフェート（ＮＡＤＰ$^+$）、チオニコチンアミド－ＮＡＤ、ピリジンアルデヒド－ＮＡＤ、アセチルピリジン－ＮＡＤ、カルバ－ＮＡＤ等）、ＦＡＤ$^+$（フラビンアデニンジヌクレオチド）等が挙げられる。これらの補酵素は、１種を単独で用いてもよいし、複数種を組み合わせて用いてもよい。これらの補酵素の中でも、好ましくはＮＡＤ$^+$、ＮＡＤＰ$^+$が挙げられる。

[0085] 還元系試薬としては、例えば、Ｎｉｔｒｏｔｅｔｒａｚｏｌｉｕｍ Ｂｌｕｅ、Ｔｅｔｒａｚｏｌｉｕｍ Ｂｌｕｅ等が挙げられる。これらの還元系試薬は、１種を単独で用いてもよいし、複数種を組み合わせて用いてもよい。

[0086] レドックスメディエータとしては、例えば、１－メトキシ－５－メチルフェナジニウムメチルスルファー、１－メトキシ－フェナジンメトサルフェート、１－メトキシ－フェナジニウムエチルスルフェート、Ｔｈｉｏｌ－ｒｅａｃｔｉｖｅ ＰＥＳ、Ａｍｉｎｅ－ｒｅａｃｔｉｖｅ ＰＥＳ等が挙げられる。これらのレドックスメディエータは、１種を単独で用いてもよいし、複数種を組み合わせて用いてもよい。これらのレドックスメディエータの中でも、好ましくは１－メトキシ－５－メチルフェナジニウムメチルスルファーが挙げられる。

[0087] 緩衝液としては、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、トリエタノールアミン緩衝液、トリス塩酸緩衝液、ＧＯＯＤの緩衝液等が挙げられる。ＧＯＯＤの緩衝液としては、例えば、ＰＩＰＥＳ、ＭＥＳ、ＭＯＰＳ等が挙げられる。これらの緩衝液は、１種を単独で用いてもよいし、複数種を組み合わせて用いてもよい。これらの緩衝液の中でも、好ましくはＧＯＯＤの緩衝液、より好ましくはＰＩＰＥＳが挙げられる。

[0088] ９．試料中のケトン体を測定する方法

本発明の試料中のケトン体を測定する方法は、３－ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ活性条件下で、ケトン体を測定すべき試料と、上記「１．改変型３－ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ（ＨＢＤＨ）」に記載の改変型ＨＢＤＨとを接触させる工程を含む。

[0089] 本発明の試料中のケトン体を測定する方法は、改変型ＨＢＤＨが触媒する以下の反応に基づいて行われる。

[0090] [化1]

$$\text{(R)-3-ヒドロキシ酪酸} + NAD^+ \Leftrightarrow \text{アセト酢酸} + NADH + H^+$$

[0091] 本発明の試料中のケトン体を測定する方法の具体的態様においては、試料中の３－ヒドロキシ酪酸を定量する。より具体的な態様においては、本発明の試料中のケトン体を測定する方法は、（ａ）３－ヒドロキシ酪酸を含む試料と、上記改変型ＨＢＤＨとを接触させる工程；（ｂ）上記改変型ＨＢＤＨにより、前記試料中の３－ヒドロキシ酪酸と、ＮＡＤ$^+$（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド）及び／又はその誘導体とを反応させる工程；及び、（ｃ）３－ヒドロキシ酪酸（Ｒ－３－ヒドロキシ酪酸）とＮＡＤ$^+$及び／又はその誘導体との反応に基づく変化を検出又は定量する工程、を含む。また、（ｂ）工程の後、（ｃ）工程の前に、改変型ＨＢＤＨの失活工程をさらに含んでもよい。

[0092] 工程（ａ）において、試料としては、ケトン体を測定すべき試料であれば特に限定されないが、例えば、ケトン体を測定すべき対象由来の生体試料が挙げられる。ケトン体を測定すべき対象としては、ヒト等の哺乳動物が挙げられる。生体試料としては、体液、排泄物及び組織が挙げられ、具体的には、血液試料（全血、血清、血漿）、尿、精液、前立腺液、涙、唾液、汗、腹水、脳脊髄液、乳汁、リンパ液、組織抽出試料等が挙げられる。

[0093] 工程（ａ）においては、改変型ＨＢＤＨは、その使用量が、試料中の３－ヒドロキシ酪酸１ｇ当たり、例えば０．１μｇ以上、好ましくは１．０μｇ以上、より好ましくは５．０μｇ以上、更に好ましくは１０μｇ以上、特に好ましくは１５μｇ以上程度となるように用いることができる。当該使用量は、その上限においても特に限定されないが、試料中の３－ヒドロキシ酪酸１ｇ当たり、例えば１００００μｇ以下、好ましくは１０００μｇ以下、より好ましくは５００μｇ以下、更に好ましくは１００μｇ以下、特に好ましくは５０μｇ以下となる量が挙げられる。これらの使用量は、予備実験を通して決定することができる。

[0094] 試料と改変型ＨＢＤＨとを接触するには、試料と改変型ＨＢＤＨとの共存系を構築すればよい。例えば、（ａ１）試料と、上記「６．酵素剤」に記載の酵素剤のうちケトン体測定用途で用いられるもの（ケトン体測定用酵素剤

）との混合液を調製すること、又は、（ａ２）上記「７．ケトン体測定用センサ」に記載のケトン体測定用センサにおいて有効成分（改変型ＨＢＤＨ）が固定されている不溶性支持体に、試料を滴下する、載置する、流す、吸収させる等、又は、試料中に前記不溶性支持体を浸漬させる等によって、試料と改変型ＨＢＤＨとの共存系を構築できる。

[0095] 試料と改変型ＨＢＤＨとの共存系には、さらに、上記「８．ケトン体測定用キット」で述べた、補酵素、還元系試薬、レドックスメディエータ、及び／又は緩衝液を含むことができる。補酵素の使用量としては、改変型ＨＢＤＨ１ｇ当たりの量で、例えば０．０１～１００ｍｏｌ、好ましくは０．１～１０ｍｏｌ、より好ましくは０．１～１０ｍｏｌ、更に好ましくは０．５～５．０ｍｏｌ、一層好ましくは０．８～３．０ｍｏｌが挙げられる。還元系試薬の使用量としては、改変型ＨＢＤＨ１ｇ当たりの量で、例えば０．０１～１００ｍｏｌ、好ましくは０．１～５０ｍｏｌ、より好ましくは０．１～１０ｍｏｌ、更に好ましくは０．５～５．０ｍｏｌ、より更に好ましくは０．８～３．０ｍｏｌが挙げられる。レドックスメディエータの使用量としては、改変型ＨＢＤＨ１ｇ当たりの量で、例えば０．０１～１００ｍｏｌ、好ましくは０．１～５０ｍｏｌ、より好ましくは０．１～１０ｍｏｌ、更に好ましくは０．５～５．０ｍｏｌ、より更に好ましくは０．８～３．０ｍｏｌが挙げられる。

[0096] 工程（ｂ）において、反応条件は、改変型ＨＢＤＨの３－ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ活性を生じさせる温度及びｐＨ条件が、当業者によって適宜選択される。例えば、反応温度としては、具体的には、例えば５～８０℃、好ましくは１０～７０℃、より好ましくは１５～６０℃、さらに好ましくは２０～５５℃、よりさらに好ましくは２５～５０℃、一層好ましくは３０～５０℃が挙げられる。反応ｐＨとしては、改変型ＨＢＤＨの至適ｐＨに基づくことができ、具体的には、３～９、好ましくは５～８、より好ましくは６～７．５が挙げられる。反応時間としては特に限定されないが、例えば１０秒～１２時間、好ましくは３０秒～１時間、より好ましくは１分～３０分が

挙げられる。これらの反応条件の最適条件は、予備実験を通して決定することができる。

[0097] なお、工程（ａ）と工程（ｂ）とはこの順に行われてもよいし、同時に行われてもよい。

[0098] 工程（ｃ）において、ＮＡＤ$^+$の誘導体としては、ＮＡＤ$^+$を基本骨格とし、ＮＡＤ$^+$と同様に、改変型ＨＢＤＨにより３－ヒドロキシ酪酸がアセト酢酸に変換されると同時に還元型を生じる物質であれば特に限定されないが、例えば、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスフェート、チオニコチンアミド－ＮＡＤ、ピリジンアルデヒド－ＮＡＤ、アセチルピリジン－ＮＡＤ、カルバ－ＮＡＤ等が挙げられる。

[0099] ３－ヒドロキシ酪酸とＮＡＤ$^+$及び／又はその誘導体との反応に基づく変化については、上記「７．ケトン体測定用センサ」で述べた通りである。３－ヒドロキシ酪酸とＮＡＤ$^+$及び／又はその誘導体との反応に基づく変化は、試料に含まれていた３－ヒドロキシ酪酸の量と相関する。このため、当該反応に基づく変化を検出又は定量することにより、試料に含まれていた３－ヒドロキシ酪酸を検出又は定量することができる。

[0100] 好ましい態様においては、生成されたＮＡＤＨ及び／又はその誘導体の量と消費されたＮＡＤ$^+$及び／又はその誘導体の量とが、試料中に存在していた３－ヒドロキシ酪酸の量と相関することに基づいて、生成されたＮＡＤＨ及び／又はその誘導体の量；消費されたＮＡＤ$^+$及び／又はその誘導体の量；並びに／若しくは、それらの量の比率を、上記反応に基づく変化の量として測定することができる。これらの量及び比率の算出方法としては、当業者が適宜決定することができる。

実施例

[0101] 以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定して解釈されるものではない。

[0102] ［改変型ＨＢＤＨのスクリーニング］

Ｒａｌｓｔｏｎｉａ　ｐｉｃｋｅｔｔｉｉからゲノムＤＮＡを抽出した。

３－ヒドロキシ酪酸脱水素酵素（ＨＢＤＨ）の遺伝子配列（配列番号１３）を鋳型として、飽和変異導入を行い、変異遺伝子産物群を得た。得られた変異遺伝子産物それぞれをｐＴｒｃ９９Ａに導入して、常法によりＥ．ｃｏｌｉ　ＪＭ１０９を形質転換した。得られた形質転換体を、ＬＢ－Ｌｅｎｎｏｘ培地（１％　Ｂａｃｔｏ　Ｔｒｙｐｔｏｎ：サーモフィッシャーサイエンティフィック社、０．５％Ｂａｃｔｏ　Ｙｅａｓｔ　Ｅｘｔｒａｃｔ：サーモフィッシャーサイエンティフィック社、０．５％塩化ナトリウム：富士フィルム和光社）で、３７℃１６時間振とう培養した。その後、Ｔｅｒｒｉｆｉｃ　Ｂｒｏｔｈ（１．２％Ｂａｃｔｏ　Ｔｒｙｐｔｏｎ：サーモフィッシャーサイエンティフィック社、２．４％　Ｂａｃｔｏ　Ｙｅａｓｔ　Ｅｘｔｒａｃｔ：サーモフィッシャーサイエンティフィック社、０．８％グリセロール：富士フィルム和光社、０．９４％リン酸水素２カリウム：富士フィルム和光社、０．２２％リン酸２水素カリウム：富士フィルム和光社）に植継し、３７℃で２０時間振とう培養した。培養液から菌体を回収し、ビーズショッカー（安井機械）を用い、菌体を常法で破砕、１５０００ｒｐｍで１０分間遠心分離した。回収した遠心上清を粗酵素液とした。

[0103] 粗酵素液を４０℃、１５分処理に供し、その後ＨＢＤＨ活性測定を行い、残存活性を算出した。評価した変異体は１５００株であったが、野生型と比べ、耐熱化効果を確認できた株はわずか１１株であった。耐熱化効果を確認できた株について、シークエンス解析を行い、置換されたアミノ酸を確認した。その結果、配列番号２～１２のアミノ酸配列を同定した。耐熱性が確認された株の粗酵素液を、吸着クロマトグラフィー、限外濾過等の常法によって精製を行い、配列番号２～１２のアミノ酸配列それぞれを有する改変型ＨＢＤＨの精製酵素サンプルとした。

[0104] ［試験例１：改変型ＨＢＤＨの耐熱性評価－１］

表２ａの比較例１（野生型ＨＢＤＨの精製酵素サンプル）及び実施例１～５（改変型ＨＢＤＨの精製酵素サンプル）を、以下の耐熱性評価に供した。

[0105] Ｂｉｏｒａｄ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　ａｓｓａｙ　ｒｅａｇｅｎｔ　（Ｂｉｏ

ｒａｄ社）を用い、調製した精製酵素サンプルのタンパク質濃度を測定した。５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．５）にて、０．１ｍｇ／ｍｌになるように精製酵素サンプルを希釈し、それぞれのタンパク質濃度を揃えた。１００μＬずつをＰＣＲチューブ（ビーエム機器社）に入れ、サーマルサイクラー（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社）にて、４０℃、４５℃、５０℃、５５℃、又は６０℃の温度条件で１５分加熱処理した。その後速やかに氷上で冷却し、得られた試料液について、以下のようにＨＢＤＨ活性を測定した。

[0106] ３－ヒドロキシ酪酸を１４５ｍｍｏｌ／Ｌ（終濃度）、ヒドラジン硫酸塩を５．８ｍｍｏｌ／Ｌ（終濃度）、ＴｒｉｔｏｎＸ－１００を０．１ｇ／ｄＬ（終濃度）、β－ＮＡＤを１３ｍｍｏｌ／Ｌ（終濃度）含む、０．１ ｍｏｌ／ＬのＴｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝液（ｐＨ８．５）に対し、２５℃で、試料液（０．１ｍｇ／ｍＬ）を所定倍率で希釈した液を１０μＬ添加した後、３４０ｎｍの吸光度変化を測定した。以下の式に基づいて、ＨＢＤＨ活性を測定した。

[0107] [化2]

ＨＢＤＨ活性＝（１分あたりに増加する吸光度A340nm）×(1/6.22)×希釈倍率
6.22：340nmにおけるNADHのミリモル吸光係数

[0108] 比較例１の各温度処理後のＨＢＤＨ活性を１００％とした場合の各実施例のＨＢＤＨ相対活性（％）を、表２ａに示す。また、４℃でのＨＢＤＨ活性を１００％とした場合の各温度処理後のＨＢＤＨ相対活性（％）を、表２ｂに示す。

[0109]

[表2a]

比較例１の各温度処理後の活性を100%とした場合の相対活性(%)

		40℃	45℃	50℃	55℃
比較例１	配列番号１	100	100	100	100
実施例１	配列番号３	131	129	362	244
実施例２	配列番号12	163		777	1698
実施例３	配列番号２	117			
実施例４	配列番号11	111			
実施例５	配列番号７	107			

[表2b]

4℃での活性を100%とした場合の各温度処理後の相対活性(%)

		4℃	40℃	45℃	50℃	55℃	60℃
比較例１	配列番号１	100	101	103	16	2	0
実施例１	配列番号３	100	104	104	46	4	1
実施例２	配列番号12	100	111		84	23	3
実施例３	配列番号２	100	117				

[0110] ［試験例２：改変型ＨＢＤＨの耐熱性評価－２］

表３ａの比較例１（野生型ＨＢＤＨの精製酵素サンプル）及び実施例４～１１（改変型ＨＢＤＨの精製酵素サンプル）を、以下の耐熱性評価に供した。

[0111] Ｂｉｏｒａｄ Ｐｒｏｔｅｉｎ ａｓｓａｙ ｒｅａｇｅｎｔ （Ｂｉｏｒａｄ社）を用い、調製した精製酵素サンプルのタンパク質濃度を測定した。５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．５）にて、０．１ｍｇ／ｍｌになるように精製酵素サンプルを希釈し、それぞれのタンパク質濃度を揃えた。１００μＬずつをＰＣＲチューブ（ビーエム機器社）に入れ、サーマルサイクラー（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社）にて、４０℃、４５℃、５０℃、５５℃、又は６０℃の温度条件で１５分加熱処理した。その後速やかに氷上で冷却し、得られた試料液について、以下のようにＨＢＤＨ活性を測定した。

[0112] ６００ｍｍｏｌ／Ｌ ３－ヒドロキシ酪酸、６０ｍｍｏｌ／Ｌ β－ＮＡ

Ｄ、６．６ｍｍｏｌ／Ｌ　１－メトキシ－５－メチルフェナジニウムメチルスルファー、６．６ｍｍｏｌ／Ｌ　ニトロテトラゾリウムブルークロリド、ＴｒｉｔｏｎＸ－１００を０．１ｇ／ｄＬ（終濃度）を含む１００ｍｍｏｌ／Ｌ　ＰＩＰＥＳ－ＮａＯＨ緩衝液（ｐＨ７．０）で構成された基質液を作製した。３７℃、２００μＬの基質液に所定倍率で希釈した試料液を１０μＬ添加した後、５７０ｎｍの吸光度変化を測定した。

[0113] [化3]

ＨＢＤＨ活性＝（１分あたりに増加する吸光度A570nm）×(1/4.02)×希釈倍率
4.02　：570nmにおけるニトロテトラゾリウムブルークロリドのミリモル吸光係数

[0114] 比較例１の各温度処理後のＨＢＤＨ活性を１００％とした場合の各実施例のＨＢＤＨ相対活性（％）を、表３ａに示す。また、４℃でのＨＢＤＨ活性を１００％とした場合の各温度処理後のＨＢＤＨ相対活性（％）を、表３ｂに示す。

[0115] [表3a]

比較例１の各温度処理後の活性を100%とした場合の相対活性(%)

		40℃	45℃	50℃	55℃
比較例１	配列番号１	100	100	100	100
実施例４	配列番号11	124	230	180	388
実施例６	配列番号４	205	409	939	1233
実施例７	配列番号10	119	238	102	283
実施例８	配列番号８	171	222	202	398
実施例５	配列番号７	105	178		
実施例９	配列番号５		117	430	350
実施例10	配列番号９		184	714	424
実施例11	配列番号６			283	217

[0116]

[表3b]

4℃での活性を100%とした場合の各温度処理後の相対活性(%)

		4℃	55℃	60℃
比較例１	配列番号１	100	2	0
実施例４	配列番号11	100	6	3
実施例６	配列番号４	100	13	2
実施例７	配列番号10	100	4	
実施例８	配列番号８	100	4	1
実施例９	配列番号５	100	10	
実施例10	配列番号９	100	7	
実施例11	配列番号６	100	9	

請求の範囲

[請求項1] 以下の（I）～（III）のいずれかに示すポリペプチドからなる改変型酵素：

（I）配列番号１に示すアミノ酸配列において、

［Ａ］第４７位アミノ酸残基の、メチオニン残基への置換、

［Ｂ］第４８位アミノ酸残基の、ヒスチジン残基への置換、

［Ｃ］第４９位アミノ酸残基の、ロイシン残基への置換、

［Ｄ］第５３位アミノ酸残基の、フェニルアラニン残基、ロイシン残基、プロリン残基、又はグルタミン酸残基への置換、

［Ｅ］第５４位アミノ酸残基の、ロイシン残基、アラニン残基、又はフェニルアラニン残基への置換、

［Ｆ］第５５位アミノ酸残基の、グリシン残基、グルタミン酸残基、メチオニン残基、又はフェニルアラニン残基への置換、

［Ｇ］第６３位アミノ酸残基の、ロイシン残基への置換、

［Ｈ］第８１位アミノ酸残基の、イソロイシン残基への置換、

［Ｉ］第１４７位アミノ酸残基の、グリシン残基への置換、

［Ｊ］第２１０位アミノ酸残基の、バリン残基への置換、

［Ｋ］第２４０位アミノ酸残基の、アラニン残基への置換、

［Ｌ］第２４１位アミノ酸残基の、フェニルアラニン残基への置換、

［Ｍ］第２５０位アミノ酸残基の、バリン残基への置換、

［Ｎ］第２５１位アミノ酸残基の、プロリン残基への置換、及び

［Ｏ］第２５２位アミノ酸残基の、イソロイシン残基への置換

のうちの、少なくともいずれかの置換が導入されたアミノ酸配列からなるポリペプチド、

（II）前記［Ａ］～［Ｏ］の少なくともいずれかに示す置換が導入されたアミノ酸配列において、前記置換されたアミノ酸残基以外の１個又は数個のアミノ酸残基が置換、付加、挿入又は欠失されてなり、且

つ、４０℃以上の温度範囲における少なくともいずれかの所定温度処理後の３－ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ活性が、配列番号１に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドの前記所定温度処理後の前記活性より向上しているポリペプチド、並びに

（III）前記［Ａ］～［Ｏ］の少なくともいずれかに示す置換が導入されたアミノ酸配列において、前記置換されたアミノ酸残基を除いた部分の配列同一性が７０％以上であり、且つ、４０℃以上の温度範囲における少なくともいずれかの所定温度処理後の３－ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ活性が、配列番号１に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドの前記所定温度処理後の前記活性より向上しているポリペプチド。

[請求項2] 請求項１に記載の改変型酵素をコードしているＤＮＡ。

[請求項3] 請求項２に記載のＤＮＡを含む発現カセット又は組換えベクター。

[請求項4] 請求項３に記載の発現カセット又は組換えベクターを用いて宿主を形質転換して得られる形質転換体。

[請求項5] 請求項４に記載の形質転換体を培養する工程を含む、改変型酵素の製造方法。

[請求項6] 請求項１に記載の改変型酵素を含む酵素剤。

[請求項7] 請求項１に記載の改変型酵素を含む、ケトン体測定用センサ。

[請求項8] 請求項１に記載の改変型酵素を含む、ケトン体測定用キット。

[請求項9] 請求項１に記載の改変型酵素活性条件下で、ケトン体を測定すべき試料と、前記改変型酵素とを接触させる工程を含む、試料中のケトン体を測定する方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/040387

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/04(2006.01)i; ***C12N 1/15***(2006.01)i; ***C12N 1/19***(2006.01)i; ***C12N 1/21***(2006.01)i; ***C12N 5/10***(2006.01)i; ***C12N 15/53***(2006.01)i; ***C12N 15/63***(2006.01)i; ***C12Q 1/32***(2006.01)i
FI: C12N9/04 Z ZNA; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/53; C12N15/63 Z; C12Q1/32

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N9/04; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/53; C12N15/63; C12Q1/32

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2025
Registered utility model specifications of Japan 1996-2025
Published registered utility model applications of Japan 1994-2025

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2021/210614 A1 (AMANO ENZYME INC.) 21 October 2021 (2021-10-21) claims, examples	1-9
A	JP 2019-511245 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 25 April 2019 (2019-04-25) claims, examples	1-9
A	JP 2019-505193 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 28 February 2019 (2019-02-28) claims, examples	1-9
A	WO 2021/149675 A1 (TOYOBO CO., LTD.) 29 July 2021 (2021-07-29) claims, examples	1-9

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
06 January 2025	**14 January 2025**

Name and mailing address of the ISA/JP	Authorized officer
Japan Patent Office (ISA/JP) **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/040387

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GROSS, H. et al. Accession No. A0A2P4RL44. Definition: SubName: Full=3-hydr oxybutyrate dehydrogenase {ECO:0000313|EMBL:POH89011.1}; DE EC=1.1.1.30 {ECO: 0000313|EMBL:MBB0172030.1};. Database UniProt/GeneSeq [online]. 2018, internet <URL: https://rest.uniprot.org/uniprotkb/A0A2P4RL44.txt>. 23 May 2018 uploaded [retrieved on 06 January 2025] in particular, columns AC, DE, OS, SQ	1-9
A	TAKANASHI, M. et al. Characterization of two 3-hydroxybutyrate dehydrogenases in poly (3-hydroxybutyrate)-degradable bacterium, Ralstonia pickettii T1. JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING. 2006, vol. 101, no. 6, pp. 501-507, ISSN:1389-1723 in particular, abstract	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/040387

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/040387

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2021/210614 A1	21 October 2021	(Family: none)	
JP 2019-511245 A	25 April 2019	US 2018/0346886 A1 claims, examples EP 3414325 A1 WO 2017/137491 A1 CN 108473966 A	
JP 2019-505193 A	28 February 2019	US 2018/0291354 A1 claims, examples EP 3394252 A1 WO 2017/109003 A1 CN 108350439 A KR 10-2018-0087329 A	
WO 2021/149675 A1	29 July 2021	(Family: none)	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/040387

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N 9/04(2006.01)i; C12N 1/15(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/53(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12Q 1/32(2006.01)i
FI: C12N9/04 Z ZNA; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/53; C12N15/63 Z; C12Q1/32

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N9/04; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/53; C12N15/63; C12Q1/32

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２５年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２５年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２５年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); UniProt/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	WO 2021/210614 A1 (天野エンザイム株式会社) 21.10.2021 (2021-10-21) 請求の範囲、実施例	1-9
A	JP 2019-511245 A (エフ. ホフマン－ラ ロシュ アーゲー) 25.04.2019 (2019-04-25) 特許請求の範囲、実施例	1-9
A	JP 2019-505193 A (エフ. ホフマン－ラ ロシュ アーゲー) 28.02.2019 (2019-02-28) 特許請求の範囲、実施例	1-9
A	WO 2021/149675 A1 (東洋紡株式会社) 29.07.2021 (2021-07-29) 請求の範囲、実施例	1-9

☑ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
"D" 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
"E" 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
"L" 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
"P" 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
"T" 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
"X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
"Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
"&" 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
06.01.2025	14.01.2025

名称及びあて先

日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）

藤澤　雅樹 4B 5802

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	GROSS H., et al., Accession No. A0A2P4RL44, Definition: SubName: Full=3-hydroxybutyrate dehydrogenase {ECO:0000313|EMBL:POH89011.1};DE EC=1.1.1.30 {ECO:0000313|EMBL:MBB0172030.1};, Database UniProt/GeneSeq [online], 2018, インターネット <URL: https://rest.uniprot.org/uniprotkb/A0A2P4RL44.txt>, 2018.05.23 uploaded [検索日 2025.01.06] 特に、ＡＣ欄、ＤＥ欄、ＯＳ欄、ＳＱ欄	1-9
A	TAKANASHI M., et al., Characterization of two 3-hydroxybutyrate dehydrogenases in poly(3-hydroxybutyrate)-degradable bacterium, Ralstonia pickettii T1, JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING, 2006, Vol.101, No.6, pp.501-507, ISSN:1389-1723 特に、要約	1-9

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/040387

第Ⅰ欄　　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. ☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
b. ☐ 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（ＰＣＴ規則13の3.1(a)）
☐ 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。

2. ☐ この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。

3. 補足意見:

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/040387

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2021/210614 A1	21.10.2021	（ファミリーなし）	
JP 2019-511245 A	25.04.2019	US 2018/0346886 A1 請求の範囲、実施例 EP 3414325 A1 WO 2017/137491 A1 CN 108473966 A	
JP 2019-505193 A	28.02.2019	US 2018/0291354 A1 請求の範囲、実施例 EP 3394252 A1 WO 2017/109003 A1 CN 108350439 A KR 10-2018-0087329 A	
WO 2021/149675 A1	29.07.2021	（ファミリーなし）	