

明 細 書

発明の名称：

ケトン体測定用酵素剤、ケトン体測定用センサ及び試料中のケトン体を測定する方法

技術分野

[0001] 本発明は、ケトン体を測定するための新たな3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼに関し、より具体的には、ケトン体測定用酵素剤、ケトン体測定用センサ及び試料中のケトン体を測定する方法に関する。

背景技術

[0002] D-3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素（HBDH：EC 1. 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、当該酸化反応の至適pHを8以上のアルカリ側に持つ酵素である。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なるため、治療に際しケトン体量をモニターして予防することが推奨される。HBDHは、ケトン体測定のための産業上重要な酵素試薬である。

[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が開示されている。また、非特許文献1には*Paracoccus denitrificans*由来のHBDH（酸化反応の至適pHは8.5）、非特許文献2には*Ralstonia pickettii* T1由来のHBDH（酸化反応の至適pHは8.5）、非特許文献3には*Mycobacterium phlei* ATCC354由来のHBDH（酸化反応の至適pHは8.4）、非特許文献4には*Staphylococcus xylosus*由来のHBDH（酸化反応の至適pHは8.6）、非特許文献5には*Pseudomonas fragi*由来のHBDH（酸化反応の至適pHは8.5）、非特許文献6には*Alcaligenes faecalis*由来のHBDH（酸化反応の至適p

Hは8.5)、非特許文献7には*Acidovorax* sp. strain SA1由来のHBDH (酸化反応の至適pHは8.5)、非特許文献8には*Bacillus cereus* T由来のHBDH (酸化反応の至適pHは8)、非特許文献9には*Zoogloea ramigera* I-16-M由来のHBDH (酸化反応の至適pHは8)が開示されている。

[0005] 一方で、特許文献2及び特許文献3に記載されるように、微生物由来のHBDHは熱に対して不安定であるため、熱安定性に優れたHBDHが望まれる。この点に鑑み、特許文献2及び特許文献3では、37℃でも安定な熱安定性に優れたHBDHとして、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が開示されている。特許文献1～3のHBDHは上市されており、今やケトン体測定用酵素のスタンダードとなっている。

[0006] 微生物から単離される野生型のHBDHは、熱安定性に優れたものであっても、その安定性はせいぜい37℃近辺であり、野生型のHBDHの熱安定性には本質的な限界がある。このため、HBDHを改変することで熱安定性を高める試みもなされている。例えば、特許文献4には、アルカリゲネス・ファエカリス由来のHBDHの3重変異体が、87℃まで安定であったことが開示されている。また、特許文献5には、ロードバクター・スファエロイデス由来のHBDHの6重変異体が、54℃まで安定であったことが開示されている。

先行技術文献

特許文献

- [0007] 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
特許文献4：特開2019-505193号公報
特許文献5：特開2019-511245号公報

非特許文献

- [0008] 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

[0009] HBDHはケトン体測定に利用される産業上の重要性が認識されていながらも、未だ市販品としてはわずかに存在するのみである。そして、市販品を含めこれまで見出されているHBDHはいずれも、その有用性に改善の余地がある。

[0010] そこで本発明は、ケトン体測定用酵素としての有用性を有する新たな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

[0011] 本発明者は、7606株の微生物をスクリーニングした結果、偶然にも、これまで知られていた3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼとは異なる至適pH特性の、中性領域に至適pHを持つ特殊なHBDHを見出した。このようなHBDHは、多くのケトン体測定用試料のpH域と重複した至適pHを有する点で有用性が高い。即ち、本発明は、下記に掲げる態様の発明を提供する。

[0012] 項1. 3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ活性を有し、前記活性の酸化反応の至適pHが6.5以上8.0未満であるポリペプチドを含む、ケトン体測定用酵素剤。

項2. 下記(1)～(3)のいずれかに示すポリペプチドを含む、項1に記載のケトン体測定用酵素剤：

- (1) 配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、
- (2) 配列番号1で示されるアミノ酸配列において、1個又は複数個のアミノ酸が置換、付加、挿入又は欠失されてなり、且つ、3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ活性及び熱安定性を有するポリペプチド、及び
- (3) 配列番号1で示されるアミノ酸配列に対する配列同一性が60%以上であり、且つ、3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ活性及び熱安定性を有するポリペプチド。

項3. pH調整剤を含まない、項1又は2に記載のケトン体測定用酵素剤。

項4. 3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ活性を有し、前記活性の酸化反応の至適pHが6.5以上8.0未満であるポリペプチドを含む、ケトン体測定用センサ。

項5. 前記ポリペプチドが、下記(1)～(3)のいずれかに示すポリペプチドである、項4に記載のケトン体測定用センサ：

- (1) 配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、
- (2) 配列番号1で示されるアミノ酸配列において、1個又は複数個のアミノ酸が置換、付加、挿入又は欠失されてなり、且つ、3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ活性及び熱安定性を有するポリペプチド、及び
- (3) 配列番号1で示されるアミノ酸配列に対する配列同一性が60%以上であり、且つ、3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ活性及び熱安定性を有するポリペプチド。

項6. 前記ポリペプチドが不溶性支持体に固定されている、項4又は5に記載のケトン体測定用センサ。

項7. 前記前記ポリペプチドが、pH調整剤を含まない組成物に含まれた形態である、項4～6のいずれかに記載のケトン体測定用センサ。

項8. 項1～3のいずれかに記載のケトン体測定用酵素剤又は項4～7のいずれかに記載のケトン体測定用センサを含む、ケトン体測定用キット。

項9. 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、項 1～3 のいずれかに記載のケトン体測定用酵素剤又は項 4～7 のいずれかに記載のケトン体測定用センサ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。

項 10. pH調整剤を用いない、項 9 に記載の方法。

項 11. 前記試料が血液試料である、項 9 又は 10 に記載の方法。

項 12. 前記試料が、糖尿病性ケトアシドーシス患者由来の試料である、項 9～11 のいずれかに記載の方法。

発明の効果

[0013] 本発明によれば、ケトン体測定用酵素としての有用性を有する新たな HBDH を用いたケトン体測定用酵素剤、ケトン体測定用センサ及びケトン体測定用キット、並びに、当該ケトン体測定用酵素剤又はケトン体測定用センサを用いた試料中のケトン体を測定する方法が提供される。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]本発明の HBDH の pH 特性の試験結果である。

[図2]本発明の HBDH の熱安定性試験結果である。

発明を実施するための形態

[0015] 以下、本発明を詳細に説明する。なお、配列表以外では、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 (Gln) 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。

[0016] また、本明細書において、表示するアミノ酸配列は、左端が N 末端、右端が C 末端である。

[0017] 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。

[0018] 1. ケトン体測定用酵素剤

1-1. 有効成分 (HBDH)

本発明のケトン体測定用酵素剤は、3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ活性を有し、前記活性の酸化反応の至適pHが6.5以上8.0未満であるポリペプチドを有効成分(HBDH)として含む。

[0019] 本発明のケトン体測定用酵素剤の前記活性の酸化反応の至適pHの好ましい範囲としては、6.7~7.8、より好ましくは7~7.5が挙げられる。

[0020] 本発明のケトン体測定用酵素剤に含まれるHBDHとしては、好ましくは、下記(1)~(3)のいずれかに示すポリペプチドが挙げられる。

[0021] (1) 配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、
(2) 配列番号1で示されるアミノ酸配列において、1個又は複数個のアミノ酸が置換、付加、挿入又は欠失されてなり、且つ、3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ活性及び熱安定性を有するポリペプチド、及び
(3) 配列番号1で示されるアミノ酸配列に対する配列同一性が60%以上であり、且つ、3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ活性及び熱安定性を有するポリペプチド。

[0022] (1)のポリペプチドは、パラバークホルデリア・ファンゴラム (*Paraburkholderia fungorum*) NBRC102489由来の3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ(HBDH)である。このHBDHは、3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ活性と共に、顕著に高い熱安定性を有する。従来、微生物から得られる野生型のHBDHの熱安定性には本

質的な限界があるというのが長年における当業者の技術常識であり、熱安定性を向上させるためには遺伝子工学的に改変する手段しかないことに鑑みると、(1)のポリペプチドが野生型であるにも関わらず顕著に高い熱安定性を奏することは極めて特徴的である。更に、(1)のポリペプチドの由来菌であるパラバクホリデリア・ファンゴラムが耐熱性ではない常温菌であることに鑑みても、(1)のポリペプチドが野生型であるにも関わらず顕著に高い熱安定性を奏することは驚くべき特徴であるといえる。

[0023] さらに、(1)のポリペプチドは、2-ヒドロキシブチレート (2-hydroxy butyrate)、乳酸、及びリンゴ酸に反応しない。

[0024] 前記(2)のポリペプチドに導入されるアミノ酸の改変は、置換、付加、挿入、および欠失の中から1種類の改変(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)を含んでいても良い。前記(2)のポリペプチドにおいて、置換、付加、挿入又は欠失されるアミノ酸は、1個又は複数個若しくは数個であればよく、例えば1~10個、好ましくは1~8個、1~6個、1~5個、又は1~4個、更に好ましくは1~3個、特に好ましくは1又は2個或いは1個が挙げられる。

[0025] また、前記(3)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対する配列同一性は、60%以上であればよいが、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上が挙げられる。さらに好ましい上記配列同一性としては、好ましくは93%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは96%以上、一層好ましくは97%以上、より一層好ましくは98%以上、特に好ましくは99%以上が挙げられる。

[0026] ここで、前記(3)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対する配列同一性とは、配列番号1に示すアミノ酸配列と比較して算出される配列同一性である。また、「配列同一性」とは、BLAST PACKAGE [s g i 3 2 b i t e d i t i o n , V e r s i o n 2 . 0 . 1 2 ; a v a i l a b l e f r o m N a t i o n a l C e n t e

r for Biotechnology Information (NCBI)] の `bl2seq` program (Tatiana A. Tatsusova, 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。

[0027] 前記(2)及び(3)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22位(I)、第160位(Y)、第164位(K)、第190位(P)、第193位(V)、第195位(T)のアミノ酸は、NADの結合に寄与していると考えられ、第98位(Q)、第147位(S)、第149位(H)、第157位(K)、第160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。

[0028] 前記(2)及び(3)のポリペプチドにアミノ酸置換が導入される場合、アミノ酸置換の態様として、保存的置換が挙げられる。即ち、(2)及び(3)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対して導入されるアミノ酸置換としては、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。

[0029] 前記(2)及び(3)のポリペプチドにおいて、「3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ活性を有する」とは、3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼとしての機能を発揮できる程度の活性を有していることを意味する。具体的には、次の測定法によって活性を確認できることをいい、具体的な比活性の値は限定されるものではないが、通常、次の測定法によって計算されるHB

DHの比活性が50U/mg以上、好ましくは100~1200U/mgであることをいう。

[0030] (HBDH活性測定法)

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)を含む0.1mol/LのTris-HCl緩衝液(pH8.5)に対し、25℃で、1mg/mLポリペプチド溶液を所定倍率(希釈倍率)で希釈したサンプル液50μLを添加した後、1分間あたりに減少する340nmの吸光度を測定する。以下の酵素活性計算式に基づいて、HBDH活性(U/mgポリペプチド)を算出する。なお、酵素活性計算式において、6.22は、340nmにおけるNADHのミリモル減少係数である。また、希釈倍率については、例えばポリペプチド溶液10μLに水40μL加えて50μLのサンプル液を調製した場合、希釈倍率は5となる。

[0031] [数1]

HBDH活性=(1分間あたりに減少する吸光度A340nm) × 1 / 6.22 × 希釈倍率

[0032] また、前記(2)及び(3)のポリペプチドにおいて、「熱安定性を有する」とは、次の測定法によって得られる50℃残存活性が80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、更に好ましくは95%以上、一層好ましくは97%以上、より一層好ましくは99%以上、特に好ましくは99.5%以上であることをいう。

[0033] (熱安定性測定方法)

ポリペプチドを100mmol/Lリン酸緩衝液(pH7.0)中0.1mg/mLとなるように溶解することでポリペプチド溶液を調製し、調製したポリペプチド溶液のHBDH活性を、上記のHBDH活性測定法に基づいて算出する。当該ポリペプチド溶液を50℃で20分間熱処理し、熱処理後におけるポリペプチド液のHBDH活性を、上記のHBDH活性測定法に基づいて算出する。熱処理後におけるポリペプチド液の残存活性の相対値(50℃残存活性)を、以下の式に基づいて算出する。

[0034] [数2]

$$50^{\circ}\text{C残存活性}(\%) = \frac{\text{熱処理後のHBDH活性}}{\text{熱処理前のHBDH活性}} \times 100$$

[0035] さらに、(2) 及び (3) のポリペプチドは、(1) のポリペプチドと同様に、2-ヒドロキシブチレート (2-hydroxy butyrate)、乳酸、及びリンゴ酸に反応しないものであることが好ましい。

[0036] (2) 及び (3) のポリペプチドは、(1) のポリペプチドと同様に野生型であってもよいし、(1) のポリペプチドの改変体であってもよい。本発明のケトン体測定用酵素剤に用いられるポリペプチドは、(1) のポリペプチドのようにパラバクホリデリア・ファンゴラム由来の野生型であっても優れた耐熱性を奏する。このような観点から、本発明のケトン体測定用酵素剤に用いられる(2) 及び(3) のポリペプチドの好適な例としては、野生型のHBDHが挙げられる。

[0037] 本発明のケトン体測定用酵素剤において、上記のポリペプチドは、1種を単独で含んでもよいし、複数種が組み合わされて含んでもよい。

[0038] 1-2. 有効成分(HBDH)の製造方法

上記の(1) ~ (3) のポリペプチドは、例えば、当該ポリペプチドをコードしているDNAを発現ベクターに導入して得られる組換えベクターを用いて宿主を形質転換し、それによって得られた形質転換体を培養することによって製造することができる。また、上記の(1) ~ (3) のポリペプチドは、野生型のものについては、産生菌((1) のポリペプチドの場合はパラバクホリデリア・ファンゴラム)を培養することで製造することもできる。

[0039] 上記ポリペプチドをコードしているDNAは、上記ポリペプチドをコードしている領域をPCR等による取得、又は、遺伝子合成法を用いた人工合成等により得ることができる。

[0040] また、塩基配列の特定の部位に特定の変異を導入する場合、変異導入方法は公知であり、例えばDNAの部位特異的変異導入法等が利用できる。塩基

配列に変異を導入したDNAは、DNAシーケンサーを用いて塩基配列を確認することができる。一旦、塩基配列が確定されると、その後は化学合成、クローニングされたプローブを鋳型としたPCR、又は当該塩基配列を有するDNA断片をプローブとするハイブリダイゼーションによって、上記ポリペプチドをコードするDNAを得ることができる。

[0041] 上記ポリペプチドをコードしているDNAの塩基配列については、当業者であれば、上記ポリペプチドのアミノ酸配列に従って適宜設計可能である。

[0042] 上記ポリペプチドをコードしているDNAの具体例としては、以下が挙げられる。

(i) 上記(1)～(3)のポリペプチドをコードするDNA、

(ii) 上記(1)～(3)のポリペプチドをコードするDNAと相補的な塩基配列を含むDNAと、ストリンジентな条件下でハイブリダイズするDNA、及び

(iii) 上記(1)～(3)のポリペプチドをコードするDNAに対して60%以上(好ましくは70%以上、80%以上、90%以上、更に好ましくは95%以上、97%以上、98%以上、特に好ましくは99%以上)の相同性を有するDNA。

[0043] 上記(1)のポリペプチドをコードするDNAの具体例としては、配列番号2が挙げられる。

[0044] 「ストリンジентな条件下」とは、0.5% SDS、5×デンハルトツ [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。

[0045] DNAの「相同性」とは、BLAST PACKAGE [sgl32 bit edition, Version 2.0.12; available from the National Center for Biot

ech nology I nformation (NCBI)] の b l 2 s e q p r o g r a m (T a t i a n a A. T a t s u s o v a, T h o m a s L. M a d d e n, F E M S M i c r o b i o l. L e t t. , V o l. 1 7 4, 2 4 7 - 2 5 0, 1 9 9 9) により得られる同一性の値を示す。パラメーターは、G a p i n s e r t i o n C o s t v a l u e : 1 1、G a p e x t e n s i o n C o s t v a l u e : 1 に設定すればよい。

[0046] 上記のDNAは、コドン利用頻度を宿主に最適化したものが好ましい。例えば、宿主として大腸菌を使用する場合であれば、コドン利用頻度を大腸菌に最適化させたDNAが好適である。

[0047] 組換えベクターには、上記のDNAに作動可能に連結されたプロモーター等の制御因子が含まれる。制御因子としては、代表的にはプロモーターが挙げられるが、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。また、作動可能に連結とは、本発明のDNAを調節するプロモーター、エンハンサー等の種々の制御因子と上記の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。

[0048] 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）、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などが好ましく挙げられる。

[0049] 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あり

、且つ自律増殖可能で本発明の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 (*Pseudomonas putida*) 等のシュードモナス属等に属する細菌；放線菌等；酵母等；糸状菌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、植物等であってもよい。これらの中でも大腸菌が特に好ましい。また、宿主としては、上記ポリペプチドの由来菌であってもよい。

[0050] 本発明の形質転換体は、宿主に上記のDNA又は上記の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又は本発明の組換えベクターを導入する方法は、目的の遺伝子が宿主に導入できる限り特に限定されない。また、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DNA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。

[0051] 宿主に上記のDNA又は組換えベクターを導入する条件は、導入方法及び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）、スフェロプラスチ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。

[0052] 形質転換体の培養条件は、宿主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。

[0053] 形質転換体を培養した後は、培養液を遠心分離等の方法により培養上清又は菌体を回収することができる。上記のポリペプチドが菌体内に蓄積されている場合であれば、菌体を超音波、フレンチプレス等の機械的方法又はリゾチーム等の溶菌酵素により処理を施し、必要に応じてプロテアーゼ等の酵素やドデシル硫酸ナトリウム（SDS）等の界面活性剤を使用することにより可溶化し、目的のポリペプチドを含む水溶性画分を得ることができる。

[0054] また、適当な発現ベクターと宿主を選択することにより、発現した目的のポリペプチドを培養液中に分泌させることもできる。

[0055] 上記のようにして得られたポリペプチドを含む培養液又は水溶性画分は、そのまま精製処理に供してもよいが、当該培養液又は水溶性画分中のポリペプチドを濃縮した後に精製処理に供してもよい。

[0056] 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、エタノールおよびアセトン）による分別沈殿法等により行うことができる。

[0057] ポリペプチドの精製処理は、例えば、ゲルろ過、疎水性クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等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。

[0058] このようにして精製されたポリペプチドは、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。

[0059] 1-3. 他の成分

本発明のケトン体測定用酵素剤は、上記ポリペプチド（有効成分）の他に、有効成分の種類、製剤形態等に応じて他の成分を含んでいてよい。

[0060] 例えば、本発明のケトン体測定用酵素剤は、上記有効成分の他、賦形剤、懸濁剤、安定剤、保存剤、防腐剤、pH調整剤、緩衝液、生理食塩水からなる群より選択される添加剤を含有することができる。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。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。保存剤としては塩化ナトリウム、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。防腐剤としては塩化ナトリウム、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。pH調整剤としては、クエン酸、塩酸、リン酸、硫酸等の酸性調整剤；水酸化ナトリウム、炭酸ナトリウム、水酸化カリウム等のアルカリ性調整剤が挙げられる。緩衝液としては、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、クエン酸リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、酒石酸緩衝液、トリス緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水等が挙げられる。

[0061] 本発明のケトン体測定用酵素剤は、有効成分として、上記（1）のポリペプチド等のように、酸化反応の至適pHが中性のものを用いることができる。このような場合、酵素の至適pH領域と試料（特に、血液試料等の体液試料）のpH領域とが重複するため、pH調整剤を用いることなく、反応系を構築することができることから、本発明のケトン体測定用酵素剤に含まれる他の成分からpH調整剤を除外することができる。つまり、本発明のケトン体測定用酵素剤の好適な例として、pH調整剤を含まないものが挙げられる。

[0062] 「pH調整剤を含まない」とは、pHを調整することを目的に用いられる物質を含まないことをいい、当該「pHを調整する」とは、少なくとも、従来のHBDHの至適pHに該当する範囲、つまり、ケトン体測定用の一般的な試料のpH範囲から外れた範囲（具体的にはpH8以上）にpHを調整することをいう。従って、本発明の好ましい形態において、pH8以上に調整するために用いられるpH調整剤を含まない場合であっても、本発明で用いられる有効成分HBDHの至適pH（6.5以上8.0未満、好ましくは6.7～7.8、より好ましくは7～7.5）にpHを調整する目的に用いられる物質を含むことは許容する。しかしながら上述のとおり、酵素の至適pH領域と試料（特に、血液試料等の体液試料）のpH領域とが重複するため

、本発明の最も好ましい形態においては、pH 8以上に調整するために用いるpH調整剤に限らず、いかなるpH調整剤の使用も不含とすることができる。

[0063] 本発明のケトン体測定用酵素剤における有効成分の含有量としては、有効成分の3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ活性が発揮される範囲で適宜設定される。

[0064] 1-4. 製剤形態

本発明のケトン体測定用酵素剤の製剤形態としては、特に限定されないが、例えば、液体、粉末、顆粒等が挙げられる。本発明のケトン体測定用酵素剤は、一般的に公知の方法で調製することができる。

[0065] 1-5. 用途

本発明のケトン体測定用酵素剤は、ケトン体測定の目的で用いられる。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。本発明のケトン体測定用酵素剤の具体的な使用方法については、後述「4. 試料中のケトン体を測定する方法」で詳述する。

[0066] 2. ケトン体測定用センサ

本発明のケトン体測定用センサは、3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ活性を有し、前記活性の酸化反応の至適pHが6.5以上8.0未満（好ましくは6.7~7.8、より好ましくは7~7.5）であるポリペプチドを有効成分（HBDH）として含む。

[0067] に含まれるHBDHとしては、好ましくは、下記（1）~（3）のいずれかに示すポリペプチドが挙げられる。

[0068] （1）配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、

（2）配列番号1で示されるアミノ酸配列において、1個又は複数個のアミノ酸が置換、付加、挿入又は欠失されてなり、且つ、3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ活性及び熱安定性を有するポリペプチド、及び

（3）配列番号1で示されるアミノ酸配列に対する配列同一性が60%以上であり、且つ、3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ活性及び熱安定性を有

するポリペプチド。

- [0069] 上記ポリペプチドの詳細、ポリペプチドの製造方法、ポリペプチドと共に用いられうる他の成分、ポリペプチドの製剤形態、及び用途については、上記「1. ケトン体測定用酵素剤」で述べた通りである。
- [0070] 本発明のケトン体測定用センサは、上記のポリペプチドを含むとともに、上記のポリペプチドによる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。
- [0071] 上記のポリペプチドによる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。
- [0072] 上記のポリペプチドによる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。
- [0073] 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）が電氣的な信号（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。
- [0074] 本発明のケトン体測定用センサにおいて、上記のポリペプチドは、不溶性支持体に固定されていることが好ましい。ポリペプチド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。
- [0075] また、ポリペプチドは、ポリペプチドが単独の形態で不溶性支持体に固定されていてもよいし、ポリペプチド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。ポリペプチド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。なお、当該組成物がpH調整剤を含まないことが好ましい点については、上記「1-3. 他の成分」において述べた通りである。

[0076] 不溶性支持体は、少なくともその表面が、上記のポリペプチドと3-ヒドロキシ酪酸との反応系中に溶解せず且つ上記のポリペプチド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。

[0077] 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。

[0078] 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、好ましくはポリペプチドが物理的固定されており、より好ましくは、ポリペプチド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。

[0079] 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。

[0080] 3. 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「1. ケトン体測定用酵素剤」に記載のケトン体測定用酵素剤又は上記「2. 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。

[0081] 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。

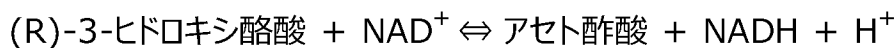
[0082] このような他のアイテムの例としては、 NAD^+ （ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド）、 NAD^+ 誘導体（例えば、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスフェート、チオニコチンアミド-NAD、ピリジンアルデヒド-NAD、アセチルピリジン-NAD、カルバー-NAD等）、レドックスメディアータ、蛍光プローブ、除タンパク質液、緩衝液（例えば、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、クエン酸リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、酒石酸緩衝液、トリス緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水等）、ランセットデバイス等が挙げられる。本発明のケトン体測定用キットは、これらの他のアイテムとして、1種を単独で含んでもよいし、複数種を組み合わせ含んでもよい。

[0083] 4. 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. ケトン体測定用酵素剤」に記載のケトン体測定用酵素剤又は上記「3. ケトン体測定用センサ」に記載のケトン体測定用センサとを接触させる工程を含む。

[0084] 本発明の試料中のケトン体を測定する方法は、上記ケトン体測定用酵素剤又は上記ケトン体測定用センサにおいて記載した有効成分（HBDH）が触媒する以下の反応に基づいて行われる。

[0085] [化1]



[0086] 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を、上記ケトン体測定用酵素剤又は上記ケトン体測定用センサとを接触させる工程；（b）上記ケトン体測定用酵素剤又は上記ケトン体測定用センサにおける有効成分（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。

[0087] 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。本発明で用いられる有効成分HBDHの酸化反応の至適pHが8未満であるため、生体試料としては、当該至適pHの範囲内のpHを有するものが好ましく、特に血液試料が好ましい。

[0088] 血液のpHは、健常者ではpH7.35～7.5である一方、血中ケトン体濃度が上昇すると低下し、重度な糖尿病性ケトアシドーシスではpH7.0以下、例えば6.7程度になりうる。従って、ケトン体を測定すべき血液試料のpHとしては、pH6.7～7.8が挙げられる。上記血液試料のpH範囲の下限は、6.8以上、又は6.9以上であってもよく、上記血液試料のpH範囲の上限は、7.5以下、7.3以下、又は7.0以下であってもよい。

[0089] 試料と上記ケトン体測定用酵素剤との接触は、試料と上記ケトン体測定用酵素剤との混合液を調製することで行うことができる。また、試料と上記ケトン体測定用センサとの接触は、上記ケトン体測定用センサにおいて有効成分（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行うことができる。

[0090] 工程（b）において、反応条件は、有効成分（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、20～40

℃、好ましくは23～30℃、より好ましくは25～27℃が挙げられる。反応pHとしては、有効成分（HBDH）の至適pHに基づくことができ、具体的には、8未満、好ましくは6.5～7.5、より好ましくは7～7.5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5秒～3時間、好ましくは10秒～10分が挙げられる。

[0091] また、工程（b）における反応系のpHとしては、好ましくはpH8未満が挙げられる。また、工程（b）における反応系のpHの好ましい例としては、pH6.7～7.8が挙げられる。上記pH範囲の下限は、6.8以上、又は6.9以上であってもよく、上記pH範囲の上限は、7.5以下、7.3以下、又は7.0以下であってもよい。

[0092] 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。

[0093] さらに、本発明の試料中のケトン体を測定する方法で上記反応を触媒する有効成分（HBDH）として、上記（1）のポリペプチド等のように、酸化反応の至適pHが中性のものを用いることができる。このような場合においては、酵素の至適pH領域と試料（特に、血液試料等の体液試料）のpH領域とが重複するため、工程（a）及び工程（b）のいずれにおいてもpH調整剤を用いることなく、反応系を構築することができる。つまり、本発明の試料中のケトン体を測定する方法の好適な例として、pH調整剤を用いない態様が挙げられる。

[0094] 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、有効成分（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、ピリジナルデヒド-NAD、アセチルピリジン-NAD、カルバー-NAD等が挙げられる。

[0095] 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「2. 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。

[0096] 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

[0097] 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。

[0098] 試験例1：有効成分（HBDH）のスクリーニング

本試験例では、天野エンザイム株式会社の保存株（7606株）の培養液より、HBDH活性を有する菌株を選択し、温度安定性を確認した。

[0099] (1) 培地組成

培養に用いた培地組成は以下の通りである。

1 g / d L 尿素

1 g / d L グルタミン酸ナトリウム

0.4 g / d L 酵母エキス

1.0 g / d L リン酸1カリウム

pH 5.5

(121°Cで20分オートクレーブした。)

[0100] (2) 手順

培養液の遠心分離により菌体を回収し、ビーズ破碎を行った後、菌体内酵素を抽出した。抽出した菌体内酵素のHBDH活性を後述(3)の方法によ

り測定し、HBDH活性が0.05 U/mL以上である酵素を、HBDH活性ありと判断した。HBDH活性ありと判断された酵素について、イオン交換クロマトグラフィーによりHBDH活性画分を回収した。

[0101] これによって得られたHBDH活性画分は、パラバークホリデリア・ファンゴラム (*Paraburkholderia fungorum*) NBRC102489に由来するものであった。

[0102] (3) HBDH活性測定法

3-ヒドロキシ酪酸を145 mmol/L (終濃度)、ヒドラジン硫酸塩を5.8 mmol/L (終濃度)、Triton X-100を0.1 g/dL (終濃度)を含む0.1 mol/LのTris-HCl緩衝液 (pH 8.5) に対し、25°Cで、測定対象試料を所定倍率 (希釈倍率) で希釈したサンプル液50 μLを添加した後、1分間あたりに減少する340 nmの吸光度を測定した。以下の酵素活性計算式に基づいて、HBDH活性 (U/mL) を算出した。なお、酵素活性計算式において、6.22は、340 nmにおけるNADHのミリモル減少係数である。

[0103] [数3]

HBDH活性 = (1分間あたりに減少する吸光度A_{340nm}) × 1 / 6.22 × 希釈倍率

[0104] (4) 精製確認

HBDH活性画分をSDS-PAGE展開し、ほぼ単一の酵素成分が含まれていることを確認した。パラバークホリデリア・ファンゴラム (*Paraburkholderia fungorum*) NBRC102489から得られたHBDH活性画分に含まれていた酵素成分の分子量 (分子量マーカーから導出) は、約28,000であった。

[0105] (5) 至適pH

実施例1のHBDHを、pHを4~9 (0.5刻み) に調整したBritton-Robinson緩衝液にそれぞれ同濃度で溶解し、上記(3)の方法に従ってHBDH活性を測定し、最大活性 (pH 7.5の場合のHBDH活性) を100とした場合の各pHにおけるHBDHの相対値 (%) を導

出した。結果を図1に示す。

[0106] 図1に示されるように、実施例1のHBDHの酸化反応の至適pHは7～7.5であった。なお、市販のHBDHの酸化反応のpHが、比較例1のHBDH、比較例2のHBDH、シュードモナス種由来のHBDH（東洋紡製）、及びロードバクター・スファエロイデス由来のHBDH（ロシュ製）のいずれも8.5であること、並びに、公知のHBDHの酸化反応のpHが8～8.6であることに鑑みると、実施例1のHBDHが、中性域の特殊な至適pHを有していることが分かった。このため、実施例1のHBDH用いて血液試料等の体液試料中のケトン体を測定する場合は、これら体液試料のpHが中性であることから、pH調整剤を用いずに測定系を構築することができ、さらには、測定に必要なNADを共存させる場合に、不安定なアルカリ性にする必要がない。加えて、図1に示される通り、実施例1のHBDHは、pHが7未満の場合でも、pH7近傍（例えばpH6.7程度）では高いHBDH活性を維持しているため、pH7を下回りうる糖尿病性ケトアシドーシス患者由来の血液試料に対しても、pH調整剤を用いることなくHBDH活性の高い測定系を構築することができる。

[0107] 試験例2：有効成分（HBDH）の諸特性

本試験例では、試験例1で得られたHBDHの諸特性を確認した。

[0108] (1) 熱安定性

下記表に示す各酵素について、酵素濃度が0.1mg/mLとなるように、100mmol/Lリン酸緩衝液（pH7.0）に溶解し、調製された酵素液について上記（3）の方法に従ってHBDH活性を測定した。調製された酵素液を、40℃、50℃、55℃、又は60℃での、20分間の処理に供し、熱処理液を得た。得られた熱処理液について試験例1の（3）の方法に従ってHBDH活性を測定した。熱処理液の残存活性の相対値を、以下の式に基づいて算出した。なお、表1の実施例1は、上記（1）～（3）の手順で取得及び確認されたHBDHの1つであり、比較例1（天野エンザイム製）及び比較例2（旭化成製）は、HBDHの市販品の中でも熱安定性が高

いものである。熱安定性試験の結果を図2に示す。

[0109] [数4]

$$50^{\circ}\text{C残存活性}(\%) = \frac{\text{熱処理後のHBDH活性}}{\text{熱処理前のHBDH活性}} \times 100$$

[0110] 図2から明らかな通り、実施例1のHBDHは野生型であるにも関わらず、顕著に高い熱安定性を示した。なお、処理温度50℃である場合の熱安定性（20分処理後の残存率）は、下記表1の通りであった。

[0111] [表1]

	由来菌	50℃残存活性(%)
実施例1	パラバークホルデリア・ファンゴラムNBRC102489	100
比較例1	ラルストニア・ピクティ	10
比較例2	アルカリゲネス・ファエカリス	26

[0112] (2) 基質特異性

実施例1のHBDHについて、2-ヒドロキシブチレート (2-hydroxy butyrate)、乳酸、及びリンゴ酸それぞれとの反応性を調べたところ、これらのいずれとも反応しないことを確認した。

[0113] 試験例3：有効成分（HBDH）の同定

本試験例では、実施例1のHBDHの配列を同定した。

[0114] パラバークホルデリア・ファンゴラム (Paraburkholderia fungorum) NBRC102489から、Easy DNA Extraction Kit ver. 2 (カネカ製) を用いてゲノムDNAを調製した。

[0115] パラバークホルデリア・ファンゴラムの公知配列情報に基づき、共通配列から以下のプライマーを設計した。

ATGTCGTCACCTGAACACGAATC (配列番号3)

TTATTGCATATACCAGCCGTG (配列番号4)

[0116] ゲノムDNAを鋳型に、設計したプライマーを用いてPCR増幅した遺伝子を取得した。常法に従いシーケンスを行った結果、遺伝子の配列は配列番

号2の通り、当該遺伝子配列から翻訳したアミノ酸配列は配列番号1の通りであった。

[0117] 次に、大腸菌発現ベクター pTrc99Aのマルチクローニング部位に、定法に従い上記取得した遺伝子を挿入した。HBDH遺伝子を導入したベクターを、大腸菌DH5 α にコンピテントセル法で導入した。得られた遺伝子導入大腸菌をLB培地で17時間培養し、遠心分離により集菌した後、ビーズ破碎により菌体内酵素を抽出した。

[0118] 得られた抽出液のHBDH活性を、試験例1の(3)の方法に基づいて測定により、HBDHが発現していることを確認した。なお、HBDH遺伝子を導入していない大腸菌ではHBDH活性を検出できないことも確認した。これらの結果から、配列番号2の遺伝子がHBDH遺伝子であることが示された。

配列表フリーテキスト

[0119] 配列番号3及び4は、プライマーである。

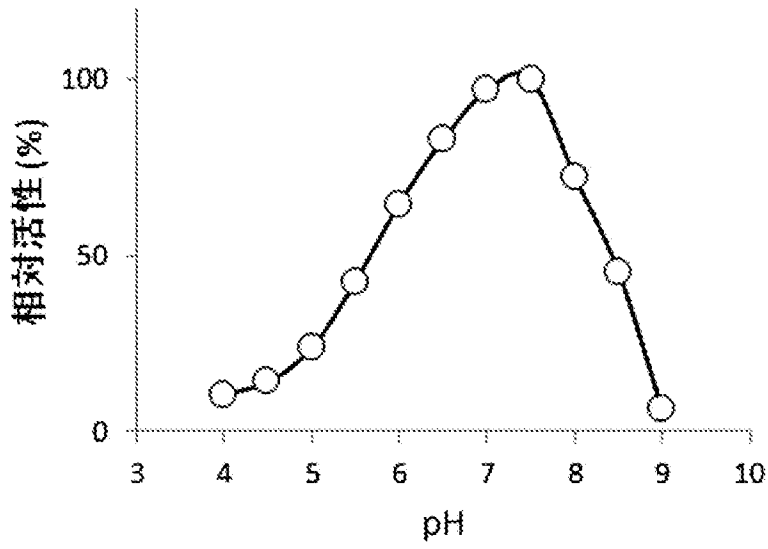
請求の範囲

- [請求項1] 3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ活性を有し、前記活性の酸化反応の至適pHが6.5以上8.0未満であるポリペプチドを含む、ケトン体測定用酵素剤。
- [請求項2] 前記ポリペプチドが、下記(1)～(3)のいずれかに示すポリペプチドである、請求項1に記載のケトン体測定用酵素剤：
- (1) 配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、
 - (2) 配列番号1で示されるアミノ酸配列において、1個又は複数個のアミノ酸が置換、付加、挿入又は欠失されてなり、且つ、3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ活性及び熱安定性を有するポリペプチド、及び
 - (3) 配列番号1で示されるアミノ酸配列に対する配列同一性が60%以上であり、且つ、3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ活性及び熱安定性を有するポリペプチド。
- [請求項3] pH調整剤を含まない、請求項1又は2に記載のケトン体測定用酵素剤。
- [請求項4] 3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ活性を有し、前記活性の酸化反応の至適pHが6.5以上8.0未満であるポリペプチドを含む、ケトン体測定用センサ。
- [請求項5] 前記ポリペプチドが、下記(1)～(3)のいずれかに示すポリペプチドである、請求項4に記載のケトン体測定用センサ：
- (1) 配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、
 - (2) 配列番号1で示されるアミノ酸配列において、1個又は複数個のアミノ酸が置換、付加、挿入又は欠失されてなり、且つ、3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ活性及び熱安定性を有するポリペプチド、及び
 - (3) 配列番号1で示されるアミノ酸配列に対する配列同一性が60%以上であり、且つ、3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ活性及び

熱安定性を有するポリペプチド。

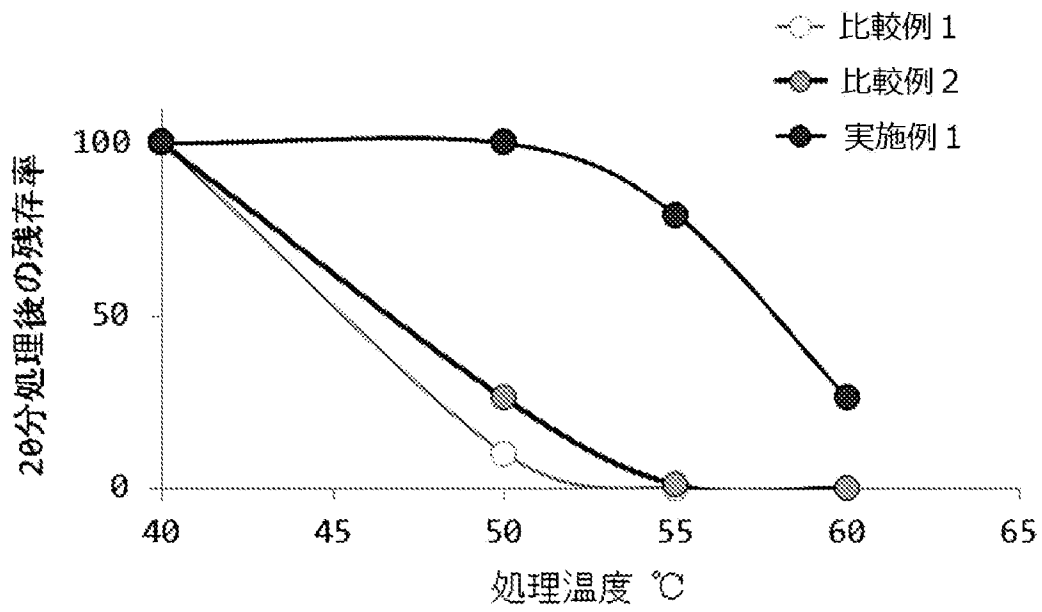
- [請求項6] 前記ポリペプチドが不溶性支持体に固定されている、請求項4又は5に記載のケトン体測定用センサ。
- [請求項7] 前記ポリペプチドが、pH調整剤を含まない組成物に含まれた形態である、請求項4～6のいずれかに記載のケトン体測定用センサ。
- [請求項8] 請求項1～3のいずれかに記載のケトン体測定用酵素剤又は請求項4～7のいずれかに記載のケトン体測定用センサを含む、ケトン体測定用キット。
- [請求項9] 3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ活性条件下で、ケトン体を測定すべき試料と、請求項1～3のいずれかに記載のケトン体測定用酵素剤又は請求項4～7のいずれかに記載のケトン体測定用センサ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。
- [請求項10] pH調整剤を用いない、請求項9に記載の方法。
- [請求項11] 前記試料が血液試料である、請求項9又は10に記載の方法。
- [請求項12] 前記試料が、糖尿病性ケトアシドーシス患者由来の試料である、請求項9～11のいずれかに記載の方法。

[図1]



[図2]

熱安定性



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/015467

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12M 1/34</i> (2006.01)i; <i>C12N 15/53</i> (2006.01)i; <i>C12Q 1/32</i> (2006.01)i; <i>C12N 9/04</i> (2006.01)i; <i>G01N 33/64</i> (2006.01)i FI: C12N15/53 ZNA; G01N33/64; C12N9/04 Z; C12M1/34 E; 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) C12M1/34; C12N15/53; C12Q1/32; C12N9/04; G01N33/64		
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 1971-2021 Registered utility model specifications of Japan 1996-2021 Published registered utility model applications of Japan 1994-2021		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq; UniProt/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 11-318438 A (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH) 24 November 1999 (1999-11-24) Particularly, claims 1-13, paragraphs [0001]-[0005], [0013]	1, 3, 4, 6-12
Y	Particularly, claims 1-13, paragraphs [0001]-[0005], [0013]	2, 5
Y	“SubName: Full=3-hydroxybutyrate dehydrogenase {ECO: 0000313 EMBL: PNE55506.1}; EC=1.1.1.30 {ECO: 0000313 EMBL: PNE55506.1}”, A0A0D5VD31, entry version 28, [online], UniProt, published on 26 February 2020, [retrieved on 11 June 2021], Internet, https://www.uniprot.org/uniprot/A0A0D5VD31.txt?version=28	2, 5
A	Particularly, the amino acid sequence	1, 3, 4, 6-12
Y	“SubName: Full=3-hydroxybutyrate dehydrogenase {ECO: 0000313 EMBL: PRZ52819.1}”, A0A2T1AW67, entry version 4, [online], UniProt, published on 11 December 2019, [retrieved on 11 June 2021], Internet, https://www.uniprot.org/uniprot/A0A2T1AW67.txt?version=4	2, 5
A	Particularly, the amino acid sequence	1, 3, 4, 6-12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 11 June 2021		Date of mailing of the international search report 06 July 2021
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/015467

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2003-339385 A (TOYOBO CO., LTD.) 02 December 2003 (2003-12-02) entire text	1-12
<hr/>		

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:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2021/015467

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 11-318438 A	24 November 1999	US 6255093 B1 Particularly, claims 1-7, column 1, lines 6-44, column 3, lines 27-41 EP 957171 A2	
JP 2003-339385 A	02 December 2003	(Family: none)	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12M 1/34(2006.01)i; C12N 15/53(2006.01)i; C12Q 1/32(2006.01)i; C12N 9/04(2006.01)i; G01N 33/64(2006.01)i FI: C12N15/53 ZNA; G01N33/64; C12N9/04 Z; C12M1/34 E; C12Q1/32</p>										
<p>B. 調査を行った分野</p>										
<p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12M1/34; C12N15/53; C12Q1/32; C12N9/04; G01N33/64</p>										
<p>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</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2021年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2021年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2021年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2021年
日本国実用新案公報	1922 - 1996年									
日本国公開実用新案公報	1971 - 2021年									
日本国実用新案登録公報	1996 - 2021年									
日本国登録実用新案公報	1994 - 2021年									
<p>国際調査で利用した電子データベース（データベースの名称、調査に利用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq; UniProt/GeneSeq</p>										
<p>C. 関連すると認められる文献</p>										
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								
X	JP 11-318438 A (ロシュ ダイアグノスティックス ゲーエムベアハー) 24.11.1999 (1999 - 11 - 24) 特に、請求項1-13、[0001] - [0005]、[0013]	1、3、 4、6-12								
Y	特に、請求項1-13、[0001] - [0005]、[0013]	2、5								
Y	” SubName: Full=3-hydroxybutyrate dehydrogenase {ECO:0000313 EMBL:PNE55506.1}; EC=1.1.1.30 {ECO:0000313 EMBL:PNE55506.1} ”, AOA0D5VD31, entry version 28, [online], UniProt, 2020年2月26日掲載, [2021年6月11日検索], インターネット, https://www.uniprot.org/uniprot/AOA0D5VD31.txt?version=28 特に、アミノ酸配列	2、5								
A	特に、アミノ酸配列	1、3、 4、6-12								
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>										
* 引用文献のカテゴリー	<p>“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</p>									
“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	<p>“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</p>									
“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	<p>“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</p>									
“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）	<p>“&” 同一パテントファミリー文献</p>									
“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										
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日									
11.06.2021	06.07.2021									
名称及びあて先	権限のある職員（特許庁審査官）									
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	伊達 利奈 4B 3960									
	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
Y	” SubName: Full=3-hydroxybutyrate dehydrogenase {EC0:0000313 EMBL:PRZ52819.1}” , A0A2T1AW67, entry version 4, [online], UniProt, 2019年 12月11日掲載, [2021年6月11日検索], インターネット, https://www.uniprot.org/ uniprot/A0A2T1AW67.txt?version=4	2、5
A	特に、アミノ酸配列	1、3、 4、6 - 1 2
A	JP 2003-339385 A (東洋紡績株式会社) 02.12.2003 (2003 - 12 - 02) 全文	1 - 1 2

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
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式
- 紙形式又はイメージファイル形式
- b. 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
- 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)
2. さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
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/JP2021/015467

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 11-318438 A	24.11.1999	US 6255093 B1 特に、請求項1-7、第1 欄6行-44行、第3欄2 7行-41行 EP 957171 A2	
JP 2003-339385 A	02.12.2003	(ファミリーなし)	