202519654

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202519654 A

(43)公開日： 中華民國 114 (2025) 年 05 月 16 日

(21)申請案號：113135488 (22)申請日： 中華民國 113 (2024) 年 09 月 19 日

(51)Int. Cl.： *C12N9/88 (2006.01)* *C12N15/60 (2006.01)*
C12N15/63 (2006.01) *C12N15/64 (2006.01)*

(30)優先權：2023/09/19 日本 2023-151690

(71)申請人：日商積水化學工業股份有限公司 (日本) SEKISUI CHEMICAL CO., LTD. (JP)
日本

(72)發明人：小野世吾 ONO, SEIGO (JP)

(74)代理人：閻啓泰；林景郁

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：16 項 圖式數：2 共 19 頁

(54)名稱

解氨酶及其用途

(57)摘要

本發明提供一種新穎之解氨酶。更詳細而言，本發明提供一種包含相對於由序列編號 1 所表示之胺基酸序列具有 80%以上之序列同源性（sequence homology）之胺基酸序列而成，且具有解氨酶活性的蛋白質。

無

【發明摘要】

【中文發明名稱】　解氨酶及其用途

【英文發明名稱】　無

【中文】

本發明提供一種新穎之解氨酶。更詳細而言，本發明提供一種包含相對於由序列編號1所表示之胺基酸序列具有80%以上之序列同源性（sequence homology）之胺基酸序列而成，且具有解氨酶活性的蛋白質。

【英文】

無

【指定代表圖】　無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】　解氨酶及其用途

【英文發明名稱】　無

【技術領域】

【0001】　本專利申請案主張基於2023年9月19日提出申請之日本專利申請案2023-151690號之優先權，並藉由引用而使該優先權基礎案中之全部揭示內容成為本說明書之一部分。

【0002】　本發明係關於一種解氨酶及其用途。

【先前技術】

【0003】　作為解氨酶，已知有來自各種生物者。

【0004】　根據非專利文獻1，植物之芳香族之解氨酶中存在僅作用於苯丙胺酸（Phe）、或作用於Phe及酪胺酸（Tyr）這兩者的酶，但並無關於組胺酸（His）之解氨酶之報告例（若為動物或微生物則有報告例）。又，於植物中，未發現僅作用於Tyr之解氨酶。進而，於非專利文獻1中，關於各酶之特異性，揭示有第148位、第276位、第405位、第415位、及第453位之胺基酸殘基有所參與，亦分析了立體結構，還揭示有已特定出各受質中參與之胺基酸之種類。

【0005】　於非專利文獻2中，分析了來自植物之Phe解氨酶之立體結構，並藉由相關胺基酸之比對，揭示了活性因第89位及第90位胺基酸而受到影響。並且，該文獻中揭示有於第89位存在His、Phe、Cys（半胱胺酸），於第90位存在Leu（白胺酸）、Glu（麩胺酸）、His，還揭示有亦存在大量除此以外之保留序列。

【0006】　非專利文獻3係關於首次自微生物中發現之TAL酶之文獻。根據該文獻，已知莢膜紅桿菌（Rhodobacter capsulatus）會製造出光敏黃蛋白

（photoactive yellow protein）這一物質，推測TAL酶參與了其生合成。其中，於該文獻中，揭示有：發現了根據基因組序列推定出之與PAL具有32%之同源性（homology）之基因序列，將該序列導入至大腸桿菌中，使其表現並比較酶活性，結果確認到對Tyr之活性，對於Phe亦發現少量活性。

【0007】 於非專利文獻4中，揭示有：自登錄於BLAST之基因中選定推定為TAL酶基因之46個序列，使其等於大腸桿菌中表現，結果其中5個成功完成了TAL酶之活性測定。於該文獻中，揭示有：尤其是來自藤黃金黃桿菌新種（Chryseobacterium luteum sp nov）之TAL酶之活性非常高，反應8小時則可生產2.03 g/L之香豆酸；又，來自膠鬚藻（Rivularia）sp PCC7116之TAL酶反應24小時而生產2.35 g/L之香豆酸，亦輕微作用於Phe。

[先前技術文獻]

[非專利文獻]

【0008】 [非專利文獻1]Jaime Barros and Richard A. Dixon: Plant Phenylalanie/Tyrosine Ammonia-lyases. Trends in Plant Science, (2020) 25, 66-79

[非專利文獻2]Gordon V Louie, Marianne E Bowman, Mchelle C Mffitt, Thomas J Baiga, Bradley S Moore, and Joseph P Noel: Structural Determinants and Modulation of Substrate Specificity in Phenylalanine-Tyrosine Ammonia-Lyases. Chemistry & Biology, (2006) 13, 1327-1338

[非專利文獻3]JA Kyndt, TE Meyer, MA Cusanovich, JJ Van Beeumen: Characterization of a bacterial tyrosine ammonia lyase, a biosynthetic enzyme for the photoactive yellow protein. FEBS Letters, (2002) 512, 240-244

[非專利文獻4]Yannik Brack, Chenghai Sun, Dong Yi, Uwe T Bornscheuer: Discovery of Novel Tyrosine Ammonia Lyases for the Enzymatic Synthesis of p-Coumaric Acid. ChemBioChem. (2022) 23, e202200062

【發明內容】

【0009】 然而，除上述以外，仍要求與以往不同之解氨酶。

【0010】 本發明之目的之一在於提供一種解氨酶及其用途。

【0011】 本發明人等進行了潛心研究，結果發現了來自綠針假單胞菌（Pseudomonas chlororaphis）之蛋白質具有解氨酶活性。本發明係基於該見解者。

【0012】 根據本發明之一態樣，提供一種蛋白質，其係包含相對於由序列編號1所表示之胺基酸序列具有80%以上之序列同源性（sequence homology）之胺基酸序列而成，且具有解氨酶活性。作為上述解氨酶活性，較佳為選自由4-胺基苯丙胺酸-解氨酶活性、酪胺酸-解氨酶活性、組胺酸-解氨酶活性及苯丙胺酸-解氨酶活性所組成之群中之至少1種活性。

【0013】 根據本發明之其他態樣，提供一種編碼上述蛋白質之核酸、包含該核酸而成之載體、及以能夠表現之方式包含該核酸或載體而成之細胞。

【0014】 根據本發明之其他態樣，提供一種製造4-胺基桂皮酸（4-ACA）之方法，該方法包括進行「以4-胺基苯丙胺酸為受質並利用本發明之蛋白質」的酶反應之步驟而成。

【0015】 根據本發明之其他態樣，提供一種製造對香豆酸之方法，該方法包括進行「以酪胺酸為受質並利用本發明之蛋白質」的酶反應之步驟而成。

【0016】 根據本發明之其他態樣，提供一種製造4-咪唑-丙烯酸之方法，該方法包括進行「以組胺酸為受質並利用本發明之蛋白質」的酶反應之步驟而成。

【0017】 根據本發明之其他態樣，提供一種製造桂皮酸之方法，該方法包括進行「以苯丙胺酸為受質並利用本發明之蛋白質」的酶反應之步驟而成。

【0018】 根據本發明，提供一種解氨酶及其用途。

【圖式簡單說明】

【0019】

[圖1]係表示以4-胺基苯丙胺酸為受質進行酶反應時之4-胺基桂皮酸（4-ACA）之生成之圖（層析圖）。由上至下表示反應前之反應液、包含大腸桿菌菌體及4-胺基桂皮酸之液、反應8小時後之反應液、反應3小時後之反應液。於反應前之反應液中，觀察到作為受質之4-胺基苯丙胺酸之峰。觀察到相較於反應3小時後，反應8小時後之4-胺基桂皮酸之峰更大。

[圖2]係表示以組胺酸為受質進行酶反應時之4-咪唑-丙烯酸之生成之圖（層析圖）。

【實施方式】

【0020】 根據本發明，提供一種具有解氨酶活性之蛋白質。藉由該解氨酶，可高效率地製造4-胺基桂皮酸（4-ACA）。又，利用該解氨酶，亦可高效率地製造對香豆酸。進而，利用該解氨酶，還可高效率地製造4-咪唑-丙烯酸。進而，利用該解氨酶，還可高效率地製造桂皮酸。

【0021】 本發明之蛋白質係包含相對於由序列編號1所表示之胺基酸序列具有80%以上、較佳為90%以上之序列同源性之胺基酸序列而成，且具有解氨酶活性的蛋白質。作為上述解氨酶活性，較佳為選自由4-胺基苯丙胺酸-解氨酶活性、酪胺酸-解氨酶活性、組胺酸-解氨酶活性及苯丙胺酸-解氨酶活性所組成之群中之至少1種活性。

【0022】 序列編號1係來自綠針假單胞菌（Pseudomonas chlororaphis）之蛋白質（PcHAL3）之胺基酸序列。編碼該胺基酸序列之核苷酸序列示於序列編號2中。本發明亦包括：不僅包含具有由序列編號1所表示之胺基酸序列之PcHAL3，亦包含相對於由序列編號1所表示之胺基酸序列具有80%以上、較佳為90%以上

之序列同源性之胺基酸序列，且具有PcHAL3所顯示之活性中之至少1種的蛋白質。

【0023】 上述活性中，4-胺基苯丙胺酸-解氨酶活性係以4-胺基苯丙胺酸為受質而生成4-胺基桂皮酸（4-ACA）之活性。又，酪胺酸-解氨酶活性係以酪胺酸為受質而生成對香豆酸之活性。又，組胺酸-解氨酶活性係以組胺酸為受質而生成4-咪唑-丙烯酸之活性。又，苯丙胺酸-解氨酶活性係以苯丙胺酸為受質而生成桂皮酸之活性。

【0024】 根據本發明之一實施方式，本發明之蛋白質係具有解氨酶活性者。根據本發明之另一實施方式，本發明之蛋白質係具有4-胺基苯丙胺酸-解氨酶活性者。根據本發明之另一實施方式，本發明之蛋白質係具有酪胺酸-解氨酶活性者。根據本發明之另一實施方式，本發明之蛋白質係具有組胺酸-解氨酶活性者。根據本發明之另一實施方式，本發明之蛋白質係具有苯丙胺酸-解氨酶活性者。

【0025】 根據本發明之較佳實施方式，本發明之蛋白質係具有4-胺基苯丙胺酸-解氨酶活性及酪胺酸-解氨酶活性者，進而較佳為具有4-胺基苯丙胺酸-解氨酶活性、酪胺酸-解氨酶活性、組胺酸-解氨酶活性及苯丙胺酸-解氨酶活性者。

【0026】 將PcHAL3之胺基酸序列（序列編號1）與來自其他生物之解氨酶之胺基酸序列進行比較，可知於序列編號1中之第90位殘基處存在苯丙胺酸（F）殘基，且於第91位殘基處存在組胺酸（H）殘基，此點係在其他解氨酶中未觀察到之特徵。根據蛋白質之三維結構，認為該第90位殘基及第91位殘基為受質識別位點，因此認為PcHAL3之特殊之受質特異性有可能源自該等殘基。因此，根據本發明之較佳實施方式，本發明之蛋白質之胺基酸序列中的相當於序列編號1中之第90位殘基之殘基為苯丙胺酸（F）殘基。根據本發明之進而較佳之實施方式，本發明之蛋白質之胺基酸序列中的相當於序列編號1中之第90位殘基之殘基為

苯丙胺酸（F）殘基，相當於序列編號1中之第91位殘基之殘基為組胺酸（H）殘基。

【0027】 本發明之蛋白質包含相對於由序列編號1所表示之胺基酸序列具有80%以上、較佳為85%以上、更佳為90%以上、進而較佳為95%以上、進而較佳為96%以上、進而較佳為97%以上、進而較佳為98%以上、進而較佳為99%以上之序列同源性之胺基酸序列。此處，胺基酸序列之序列同源性可使用於該技術領域中公知之演算法，例如BLASTP等，於預設設定下進行特定。

【0028】 根據本發明之尤佳之實施方式，本發明之蛋白質係包含由序列編號1所表示之胺基酸序列者。

【0029】 本發明之核酸係編碼本發明之蛋白質（之胺基酸序列）者。核酸之種類並無特別限制，可為DNA、RNA、或其等之組合中之任一種，較佳為DNA。本發明之核酸只要編碼本發明之蛋白質（之胺基酸序列），則其具體之核苷酸序列並無特別限制，例如包含由序列編號2所表示之核苷酸序列，或者包含相對於由序列編號2所表示之核苷酸序列具有80%以上、較佳為85%以上、較佳為90%以上、更佳為95%以上、進而較佳為96%以上、進而較佳為97%以上、進而較佳為98%以上、進而較佳為99%以上之序列同源性之核苷酸序列。此處，核苷酸序列之序列同源性可使用於該技術領域中公知之演算法，例如BLASTN等，於預設設定下進行特定。又，本發明之核酸可導入至宿主細胞中並於該細胞中表現，於此情形時，可根據宿主細胞之種類，設計成包含大量較佳之密碼子。

【0030】 本發明之載體係包含本發明之核酸者。載體係用以將基因等表現用核酸構建物導入至宿主細胞中之質體，根據所使用之宿主細胞之種類，已知有各種載體。於本發明中，亦只要根據所使用之宿主細胞之種類選擇適宜者即可。又，將本發明之核酸組入至載體中亦只要以能夠於宿主細胞中表現之方式組入即可，本發明所屬技術領域中具有通常知識者可適當地進行。例如，於宿主細胞

為細菌等原核生物之情形時，作為該載體，可使用「能夠於宿主細胞中自主複製或能夠組入至染色體中，且於能夠轉錄所插入之上述核酸之位置處含有啟動子者」。例如可使用該載體，於宿主細胞內構建由啟動子、核糖體結合序列、上述基因、及轉錄終止序列所構成之一系列結構。

【0031】 本發明之細胞係以能夠表現之方式包含本發明之核酸或本發明之載體之細胞。此種細胞可根據所使用之細胞之種類，使用以上述方式構建之載體來進行製作。

【0032】 細胞（宿主細胞）之種類並無特別限制，可為原核細胞及真核細胞中之任一種。作為原核細胞之例，可例舉細菌、放線菌等。作為真核細胞之例，可例舉酵母、絲狀菌、真核微藻類、植物細胞、動物細胞等。作為本發明所使用之細胞，就其處理容易性或表現效率等理由而言，可例舉較佳為細菌或酵母，更佳為細菌，進而較佳為大腸桿菌。

【0033】 根據本發明，提供一種利用本發明之蛋白質之有用物質之製造方法。具體而言，提供如下方法：

（i）一種方法，其係製造4-胺基桂皮酸（4-ACA）之方法，且包括進行「以4-胺基苯丙胺酸為受質並利用本發明之蛋白質」的酶反應之步驟而成；

（ii）一種方法，其係製造對香豆酸之方法，且包括進行「以酪胺酸為受質並利用本發明之蛋白質」的酶反應之步驟而成；

（iii）一種方法，其係製造4-咪唑-丙烯酸之方法，且包括進行「以組胺酸為受質並利用本發明之蛋白質」的酶反應之步驟而成；及

（iv）一種方法，其係製造桂皮酸之方法，且包括進行「以苯丙胺酸為受質並利用本發明之蛋白質」的酶反應之步驟而成。

【0034】 上述酶反應可藉由本發明所屬技術領域中具有通常知識者所公知之方法來進行，例如，於培養表現本發明之蛋白質之細胞（例如細菌）時，可

藉由將受質添加至培養基中來進行，亦可將表現本發明之蛋白質之細胞或該細胞之破碎液添加至受質溶液中來進行，還可將單離出之本發明之蛋白質添加至受質溶液中來進行，還可藉由使受質溶液與固定有單離出之本發明之蛋白質之支持體（管柱等）接觸來進行。此時之溫度或pH之條件可參考要使用之蛋白質作為酶之最佳溫度及最佳pH來決定，或者亦可參考適於培養表現細胞（例如細菌）之溫度及pH來決定。根據本發明之較佳實施方式，用於酶反應之本發明之蛋白質係由本發明之細胞供給者。

【0035】 本說明書中所提及之序列資訊彙總於以下表中。

[表1]

表 1：序列資訊

本發明之蛋白質之胺基酸序列（序列編號 1）
MTTHPLEPVTFGELPLRIEDVLALANRQAPTRLQDDSAFRQRIAKGAQFLDSLLDKEGVIYGVTTGYGDSCVVAVPLQ HVEALPRHLYTFHGCGLGKLLDAQATRAVLAARLQSLCHGVSGVRVELLERLQAFLEHDILPLIPEEGSVGASGDLTP LSYVAATLSGEREVMFRGERRTSAEVHRELGWEPLVLRPKEALALMNGTAVMTGLACLAFARADYLLQLATRITALNV VALQGNPEHFDERLFAAKPHPGQMQVAAWLRQDLAIDAPTAPLHRLQDRYSLRCAPHVLGVLADSLGWLRGFIETELN SANDNPIIDAEAERVLHGGHFYGGHIAFAMDSLKNLVANVADLLDRQLALLVDERYNHGLPSNLSGAPADRAMINHGF KAVQIGTSAWTAEALKNTMPASVFSRSTECHNQDKVSMGTIAARDAIRVLELTEQVAAATLLAANQGVWLRGRAEDAR PLPPALAAMHQELAKDFPPVIEDRALEGELRLCLQRIAEQHWRLHA
編碼本發明之蛋白質之核苷酸序列（序列編號 2）
ATGACAACGCATCCATTGGAGCCTGTGACATTTGGCGAGTTACCCTTACGAATTGAGGATGTATTGGCTCTTGCTAAT CGCCAAGCCCCAACAAGATTACAAGATGATAGCGCATTTCGACAAAGAATTGCTAAGGGCGCTCAATTTCTTGATTCC CTCTTAGACAAGGAAGGTGTCATTTATGGAGTCACGACGGGATATGGGGATTCATGTGTGGTCGCAGTGCCTCTTCAA CATGTAGAGGCATTGCCTAGACATTTATATACGTTTCATGGCTGTGGGTTAGGAAAGTTATTGGATGCCCAAGCTACA CGCGCAGTGCTCGCAGCCCGCTTGCAAAGTCTTTGTCATGGGGTGAGTGGCGTGAGAGTGGAGTTATTGGAGCGCCTT CAAGCCTTTCTTGAGCATGATATTTTGCCCCTCATACCAGAGGAAGGATCAGTAGGAGCAAGCGGAGATCTCACACCA CTCAGCTATGTGGCAGCTACTTTAAGCGGCGAGCGAGAGGTCATGTTTCGCGGCGAGCGACGGACGAGTGCAGAGGTA CATCGGGAGCTTGGCTGGGAGCCCTTAGTGTTGAGACCAAAAGAGGCACTTGCCTTAATGAATGGGACAGCAGTGATG ACAGGCTTGGCTTGTTTGGCCTTTGCCCGCGCTGATTATTTACTTCAATTAGCTACAAGAATAACTGCATTGAATGTC GTGGCATTGCAAGGAAATCCAGAGCATTTTGATGAGCGGCTCTTTGCAGCAAAGCCTCATCCAGGCCAAATGCAAGTC GCTGCCTGGCTCCGGCAAGATCTTGCTATTGATGCACCTACGGCACCATTACATCGGCTCCAAGATCGGTATAGTCTC CGGTGTGCTCCTCATGTATTGGGAGTCTTAGCTGATAGTTTAGGCTGGCTTAGAGGATTTATAGAGACGGAGCTTAAT TCAGCTAATGATAATCCCATTATTGATGCTGAGGCAGAGCGCGTCCTTCATGGCGGCCACTTTTATGGCGGCCATATT GCCTTTGCAATGGATTCATTAAAGAATTTGGTCGCCAATGTCGCAGATCTTCTCGATCGCCAACTTGCACTCCTCGTG GATGAGCGATATAACCATGGCTTGCCATCAAATCTCAGCGGAGCCCCAGCTGATCGCGCTATGATTAATCATGGATTT AAGGCTGTGCAAATTGGCACTTCCGCATGGACGGCAGAGGCATTAAAGAATACTATGCCAGCAAGTGTCTTTAGCAGA AGCACGGAGTGTCATAATCAAGATAAGGTCAGTATGGGGACAATAGCAGCTCGGGATGCTATTCGCGTGCTTGAGCTT ACGGAGCAAGTGGCAGCAGCCACATTATTAGCCGCAAATCAAGGGGTGTGGCTTCGGGGCCGGGCAGAGGATGCCAGA CCACTTCCACCAGCATTGGCCGCCATGCATCAAGAGTTAGCCAAGGATTTTCCGCCTGTAATTGAGGATAGAGCCCTC GAGGGCGAGTTACGGTTGTGTTTACAACGGATAGCAGAGCAACATTGGCGCCTTCATGCATAA

[實施例]

【0036】 以下，基於實施例，對本發明進一步具體地進行說明，但本發明並不僅限定於該等實施例。

【0037】 將來自綠針假單胞菌（Pseudomonas chlororaphis）之蛋白質（PcHAL3。胺基酸序列示於序列編號1中，編碼其之核苷酸序列示於序列編號2中）之胺基酸序列與來自其他生物之解氨酶之胺基酸序列進行比較，可知於序列編號1中之第90位殘基處存在苯丙胺酸（F）殘基，且於第91位殘基處存在組胺酸（H）殘基，此點係於其他解氨酶中未觀察到之特徵。根據蛋白質之三維結構，認為該第90位殘基及第91位殘基為受質識別位點，因此認為該蛋白質（PcHAL3）有可能為具有與其他解氨酶不同之受質特異性之新穎之解氨酶。

【0038】 對此，於本實施例中，藉由宿主細胞中之重組表現而生合成上述蛋白質（PcHAL3），並研究其解氨酶活性。作為宿主細胞使用大腸桿菌（Escherichia coli）。

【0039】 （1）以4-胺基苯丙胺酸及組胺酸為受質之酶活性

對將4-胺基苯丙胺酸及組胺酸用作受質時之PcHAL3之酶活性進行測定。以下示出測定條件及測定結果。

【0040】 測定條件

試劑：4-胺基苯丙胺酸；

4-胺基桂皮酸；

組胺酸；

4-咪唑-丙烯酸。

反應液：10 mM 4APhe（100 mM Tris-HCl緩衝液，pH8.6）（受質液）

10 mM His（100 mM Tris-HCl緩衝液，pH8.6）（受質液）

將大腸桿菌利用Tris-HCl濃縮成OD600成為10（具體而言，培養大腸桿菌之

培養液之OD600約為2～3，對該培養液進行離心以使菌沈降，添加Tris-HCl以使OD600最終成為10）。

反應條件：使用「於10 mM 4APhe之受質液或10 mM His之受質液中添加有表現PcHAL3之上述大腸桿菌之菌體的反應液」，於37℃反應3～8小時（於以組胺酸為受質之情形時，進行反應3小時，於以4-胺基苯丙胺酸為受質之情形時，進行反應2次，反應時間分別設為3小時及8小時）。

攪拌速度：450 rpm

樣品製備：藉由離心分離而去除菌，測定上清液。

HPLC：管柱：C18（4.6×150 mm/4.6×250 mm）。

流動相：A：20 mM磷酸鉀緩衝液；

B：甲醇。

流速：0.8 ml/分鐘

程式：2%甲醇7分鐘→以5分鐘梯度並至50%甲醇為止→歷時2分鐘至98%甲醇→維持4分鐘後結束

檢測：280 nm/210 nm

樣品量：5 μl

【0041】 結果

結果示於圖1及圖2中。根據該等圖可知，使用4-胺基苯丙胺酸作為受質時高效率地生成4-胺基桂皮酸（4-ACA），使用組胺酸作為受質時高效率地生成4-咪唑-丙烯酸。

【0042】 （2）以苯丙胺酸及酪胺酸為受質之酶活性

測定使用苯丙胺酸及酪胺酸作為受質時之PcHAL3之酶活性。以下示出測定條件及測定結果。

【0043】 測定條件

試劑：苯丙胺酸；

桂皮酸；

酪胺酸；

對香豆酸。

反應液：10 mM苯丙胺酸（100 mM Tris-HCl緩衝液，pH8.5）（受質液）

1 mM酪胺酸（70 mM 焦磷酸鈉緩衝液，pH9.3）（受質液）

將大腸桿菌利用緩衝液濃縮成OD600成為10。

反應條件：使用「於10 mM苯丙胺酸之受質液或1 mM酪胺酸之受質液中添加有表現PcHAL3之上述大腸桿菌之菌體的反應液」，於37℃進行反應1小時。

攪拌速度：450 rpm

樣品製備：藉由離心分離而去除菌，測定上清液。

HPLC：管柱：C18（4.6×150 mm/4.6×250 mm）。

流動相：A：20 mM磷酸鉀緩衝液；

B：甲醇。

流速：0.8 ml/分鐘

程式：2%甲醇7分鐘→以5分鐘梯度並至50%甲醇為止→歷時2分鐘至98%甲醇→維持4分鐘後結束

檢測：280 nm

樣品量：5 μl

【0044】 結果

[表2]

表 2：酶活性

受質→產物	產量	產率
苯丙胺酸→桂皮酸	0.16 mM	1.6%
酪胺酸→對香豆酸	0.64 mM	64.0%

【0045】 根據上述表可知，使用苯丙胺酸作為受質時高效率地生成桂皮

酸，使用酪胺酸作為受質時高效率地生成對香豆酸。

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing  nonEnglishFreeTextLanguageCode="tw" dtdVersion="V1_3"
fileName="FCP072397.SEQ.xml" softwareName="WIPO Sequence"
softwareVersion="2.3.0" productionDate="2025-01-17">
 <ApplicationIdentification>
  <IPOfficeCode>TW</IPOfficeCode>
  <ApplicationNumberText>113135488</ApplicationNumberText>
  <FilingDate>2024-09-19</FilingDate>
 </ApplicationIdentification>
 <ApplicantFileReference>24P00697TW00</ApplicantFileReference>
 <EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <IPOfficeCode>JP</IPOfficeCode>
  <ApplicationNumberText>2023-151690</ApplicationNumberText>
  <FilingDate>2023-09-19</FilingDate>
 </EarliestPriorityApplicationIdentification>
 <ApplicantName languageCode="zh">積水化學工業股份有限公司</ApplicantName>
 <ApplicantNameLatin>Sekisui Chemical Co., Ltd.</ApplicantNameLatin>
 <InventorName languageCode="ja">小野,世吾</InventorName>
 <InventorNameLatin>ONO, Seigo</InventorNameLatin>
 <InventionTitle languageCode="zh">解氨酶及其用途</InventionTitle>
 <SequenceTotalQuantity>2</SequenceTotalQuantity>
 <SequenceData sequenceIDNumber="1">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>514</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..514</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q1">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>Pseudomonas chlororaphis</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>綠針假單胞菌</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MTTHPLEPVTFGELPLRIEDVLALANRQAPTRLQDDSAFRQRIAKGAQFLDSLLDKEGVIYG
VTTGYGDSCVVAVPLQHVEALPRHLYTFHGCGLGKLLDAQATRAVLAARLQSLCHGVSGVRVELLERLQAFLEHDILPLI
PEEGSVGASGDLTPLSYVAATLSGEREVMFRGERRTSAEVHRELGWEPLVLRPKEALALMNGTAVMTGLACLAFARADYL
LQLATRITALNVVALQGNPEHFDERLFAAKPHPGQMQVAAWLRQDLAIDAPTAPLHRLQDRYSLRCAPHVLGVLADSLGW
LRGFIETELNSANDNPIIDAEAERVLHGGHFYGGHIAFAMDSLKNLVANVADLLDRQLALLVDERYNHGLPSNLSGAPAD
RAMINHGFKAVQIGTSAWTAEALKNTMPASVFSRSTECHNQDKVSMGTIAARDAIRVLELTEQVAAATLLAANQGVWLRG
RAEDARPLPPALAAMHQELAKDFPPVIEDRALEGELRLCLQRIAEQHWRLHA</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="2">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>1545</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..1545</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>genomic DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q2">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Pseudomonas chlororaphis</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>綠針假單胞菌</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgacaacgcatccattggagcctgtgacatttggcgagttacccttacgaattgaggatgt
attggctcttgctaatcgccaagccccaacaagattacaagatgatagcgcatttcgacaaagaattgctaagggcgctc
aatttcttgattccctcttagacaaggaaggtgtcatttatggagtcacgacgggatatggggattcatgtgtggtcgca
```

gtgcctcttcaacatgtagaggcattgcctagacatttatatacgtttcatggctgtgggttaggaaagttattggatgc
ccaagctacacgcgcagtgctcgcagcccgcttgcaaagtctttgtcatggggtgagtggcgtgagagtggagttattgg
agcgccttcaagcctttcttgagcatgatattttgcccctcataccagaggaaggatcagtaggagcaagcggagatctc
acaccactcagctatgtggcagctactttaagcggcgagcgagaggtcatgtttcgcggcgagcgacggacgagtgcaga
ggtacatcgggagcttggctgggagcccttagtgttgagaccaaaagaggcacttgccttaatgaatgggacagcagtga
tgacaggcttggcttgtttggcctttgcccgcgctgattatttacttcaattagctacaagaataactgcattgaatgtc
gtggcattgcaaggaaatccagagcattttgatgagcggctctttgcagcaaagcctcatccaggccaaatgcaagtcgc
tgcctggctccggcaagatcttgctattgatgcacctacggcaccattacatcggctccaagatcggtatagtctccggt
gtgctcctcatgtattgggagtcttagctgatagtttaggctggcttagaggatttatagagacggagcttaattcagct
aatgataatcccattattgatgctgaggcagagcgcgtccttcatggcggccacttttatggcggccatattgcctttgc
aatggattcattaaagaatttggtcgccaatgtcgcagatcttctcgatcgccaacttgcactcctcgtggatgagcgat
ataaccatggcttgccatcaaatctcagcggagccccagctgatcgcgctatgattaatcatggatttaaggctgtgcaa
attggcacttccgcatggacggcagaggcattaaagaatactatgccagcaagtgtctttagcagaagcacggagtgtca
taatcaagataaggtcagtatggggacaatagcagctcgggatgctattcgcgtgcttgagcttacggagcaagtggcag
cagccacattattagccgcaaatcaaggggtgtggcttcggggccgggcagaggatgccagaccacttccaccagcattg
gccgccatgcatcaagagttagccaaggattttccgcctgtaattgaggatagagccctcgagggcgagttacggttgtg
tttacaacggatagcagagcaacattggcgccttcatgcataa</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
</ST26SequenceListing>

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種蛋白質，其係包含相對於由序列編號1所表示之胺基酸序列具有80%以上之序列同源性（sequence homology）之胺基酸序列而成，且具有解氨酶活性。

【請求項2】一種蛋白質，其係包含相對於由序列編號1所表示之胺基酸序列具有90%以上之序列同源性之胺基酸序列而成，且具有解氨酶活性。

【請求項3】如請求項1或2之蛋白質，其中，上述解氨酶活性為選自由4-胺基苯丙胺酸-解氨酶活性、酪胺酸-解氨酶活性、組胺酸-解氨酶活性及苯丙胺酸-解氨酶活性所組成之群中之至少1種活性。

【請求項4】如請求項1之蛋白質，其中，相當於序列編號1中之第90位殘基之殘基為苯丙胺酸（F）殘基。

【請求項5】如請求項1之蛋白質，其中，相當於序列編號1中之第90位殘基之殘基為苯丙胺酸（F）殘基，且相當於序列編號1中之第91位殘基之殘基為組胺酸（H）殘基。

【請求項6】如請求項1之蛋白質，其具有4-胺基苯丙胺酸-解氨酶活性及酪胺酸-解氨酶活性。

【請求項7】如請求項1之蛋白質，其具有4-胺基苯丙胺酸-解氨酶活性、酪胺酸-解氨酶活性、組胺酸-解氨酶活性及苯丙胺酸-解氨酶活性。

【請求項8】如請求項1之蛋白質，其係包含由序列編號1所表示之胺基酸序列而成。

【請求項9】一種核酸，其編碼請求項1之蛋白質。

【請求項10】一種載體，其係包含請求項7之核酸而成。

【請求項11】一種細胞，其係以能夠表現之方式包含請求項9之核酸或請求項10之載體而成。

【請求項12】一種方法，其係製造4-胺基桂皮酸（4-ACA）之方法，且包括進行以4-胺基苯丙胺酸為受質並利用請求項1之蛋白質的酶反應之步驟而成。

【請求項13】一種方法，其係製造對香豆酸之方法，且包括進行以酪胺酸為受質並利用請求項1之蛋白質的酶反應之步驟而成。

【請求項14】一種方法，其係製造4-咪唑-丙烯酸之方法，且包括進行以組胺酸為受質並利用請求項1之蛋白質的酶反應之步驟而成。

【請求項15】一種方法，其係製造桂皮酸之方法，且包括進行以苯丙胺酸為受質並利用請求項1之蛋白質的酶反應之步驟而成。

【請求項16】如請求項12至15中任一項之方法，其中，上述蛋白質係由請求項11之細胞供給者。

圖(發明圖式)

4-胺基苯丙酸種

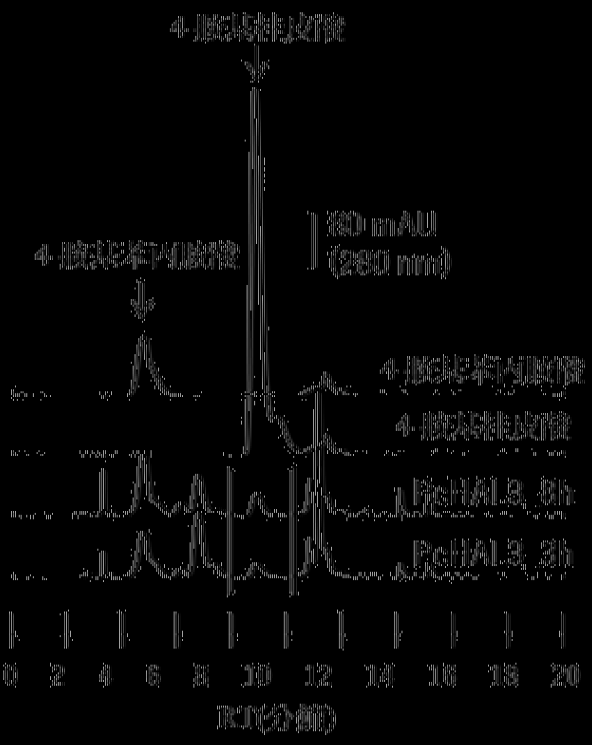


圖1

組胺酸種

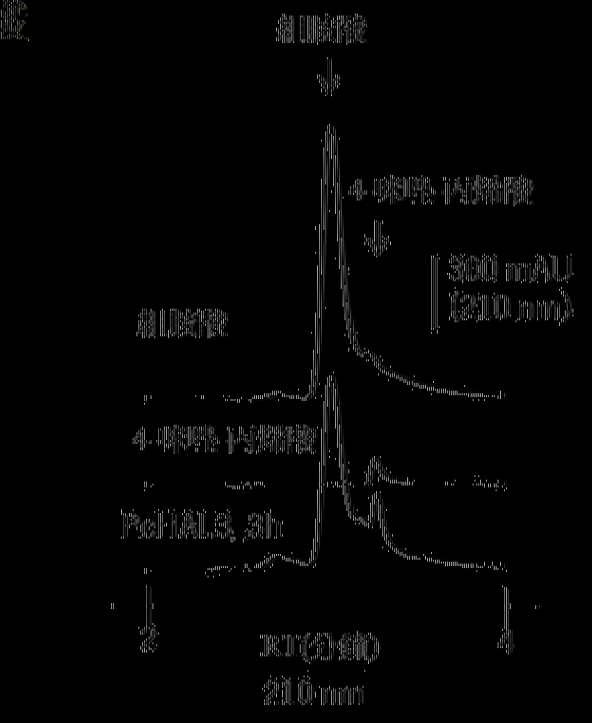


圖2

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種蛋白質，其係包含相對於由序列編號1所表示之胺基酸序列具有80%以上之序列同源性（sequence homology）之胺基酸序列而成，且具有解氨酶活性。

【請求項2】一種蛋白質，其係包含相對於由序列編號1所表示之胺基酸序列具有90%以上之序列同源性之胺基酸序列而成，且具有解氨酶活性。

【請求項3】如請求項1或2之蛋白質，其中，上述解氨酶活性為選自由4-胺基苯丙胺酸-解氨酶活性、酪胺酸-解氨酶活性、組胺酸-解氨酶活性及苯丙胺酸-解氨酶活性所組成之群中之至少1種活性。

【請求項4】如請求項1或2之蛋白質，其中，相當於序列編號1中之第90位殘基之殘基為苯丙胺酸（F）殘基。

【請求項5】如請求項1或2之蛋白質，其中，相當於序列編號1中之第90位殘基之殘基為苯丙胺酸（F）殘基，且相當於序列編號1中之第91位殘基之殘基為組胺酸（H）殘基。

【請求項6】如請求項1或2之蛋白質，其具有4-胺基苯丙胺酸-解氨酶活性及酪胺酸-解氨酶活性。

【請求項7】如請求項1或2之蛋白質，其具有4-胺基苯丙胺酸-解氨酶活性、酪胺酸-解氨酶活性、組胺酸-解氨酶活性及苯丙胺酸-解氨酶活性。

【請求項8】如請求項1或2之蛋白質，其係包含由序列編號1所表示之胺基酸序列而成。

【請求項9】一種核酸，其編碼請求項1之蛋白質。

【請求項10】一種載體，其係包含請求項9之核酸而成。

【請求項11】一種細胞，其係以能夠表現之方式包含請求項9之核酸或請求項10之載體而成。

【請求項12】一種4-胺基桂皮酸（4-ACA）之製造方法，其包括進行以4-胺基苯丙胺酸為受質並利用請求項1之蛋白質的酶反應之步驟而成。

【請求項13】一種對香豆酸之製造方法，其包括進行以酪胺酸為受質並利用請求項1之蛋白質的酶反應之步驟而成。

【請求項14】一種4-咪唑-丙烯酸之製造方法，其包括進行以組胺酸為受質並利用請求項1之蛋白質的酶反應之步驟而成。

【請求項15】一種桂皮酸之製造方法，其包括進行以苯丙胺酸為受質並利用請求項1之蛋白質的酶反應之步驟而成。

【請求項16】如請求項12至15中任一項之方法，其中，上述蛋白質係由請求項11之細胞供給者。