(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3月27日(27.03.2025)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2025/063255 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/60 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C07D 233/64 (2006.01) *C12N 9/88* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) *C12P 7/40* (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) *C12P 17/10* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2024/033555

(22) 国際出願日： 2024年9月19日(19.09.2024)

(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 2023-151690 2023年9月19日(19.09.2023) JP

(71) 出願人: 積水化学工業株式会社 (**SEKISUI CHEMICAL CO., LTD.**) [JP/JP]; 〒5308565 大阪府大阪市北区西天満２丁目４番４号 Osaka (JP).

(72) 発明者: 小野 世吾 (**ONO Seigo**); 〒3004247 茨城県つくば市和台３２ 積水化学工業株式会社内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 宮嶋 学, 外(**MIYAJIMA Manabu** et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内１丁目６番６号 日本生命丸の内ビル 協和特許法律事務所 Tokyo (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, 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：
— 国際調査報告（条約第21条(3)）
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

WO 2025/063255 A1

(54) **Title:** AMMONIA LYASE AND USE THEREOF

(54) 発明の名称： アンモニアリアーゼおよびその用途

(57) **Abstract:** The present invention provides a novel ammonia lyase. More specifically, the present invention provides a protein comprising an amino acid sequence having 80% or more sequence homology to the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 and having ammonia lyase activity.

(57) 要約：本発明は新規なアンモニアリアーゼを提供する。より詳細には配列番号１で表されるアミノ酸配列に対して８０％以上の配列相同性を有するアミノ酸配列を含んでなり、かつ、アンモニアリアーゼ活性を有するタンパク質を提供する。

明　細　書

発明の名称 ： アンモニアリアーゼおよびその用途

関連出願の参照

[0001] 本特許出願は、２０２３年９月１９日に出願された日本国特許出願２０２３－１５１６９０号に基づく優先権の主張を伴うものであり、かかる先の特許出願における全開示内容は、引用することにより本明細書の一部とされる。

技術分野

[0002] 本発明は、アンモニアリアーゼおよびその用途に関する。

背景技術

[0003] アンモニアリアーゼとしては、様々な生物に由来するものが知られている。

[0004] 非特許文献１によれば、植物の芳香族のアンモニアリアーゼには、フェニルアラニン（Phe）のみ、もしくはPheとチロシン（Tyr）の両方に作用する酵素が存在するが、ヒスチジン（His）のアンモニアリアーゼについては報告例がない（動物や微生物ではあり）。また、植物ではTyrのみに作用するアンモニアリアーゼは見つかっていない。さらに、非特許文献１には、それぞれの酵素の特異性に関して、148番目、276番目、405番目、415番目、および453番目のアミノ酸残基が関与していることが開示され、また、立体構造も解析されており、各基質で関与しているアミノ酸の種類が特定されていることも開示されている。

[0005] 非特許文献２では、植物由来のPheアンモニアリアーゼの立体構造が解析され、関連するアミノ酸のアライメントによって、89番目と90番目のアミノ酸によって活性が影響を受けていることが開示されている。そして、同文献には、89番目にはHis、Phe、Cys（システイン）が存在し、90番目にはLeu（ロイシン）、Glu（グルタミン酸）、Hisが存在することが開示され、また、それ以外の保存された配列も多く存在することが開示されている。

[0006] 非特許文献３は、微生物から初めて見出されたTAL酵素に関する文献である。同文献によれば、Rhodobacter capsulatusはphotoactive yellow proteinという物質を作っていることが知られており、その生合成にTAL酵素が関与していることが推察された。そこで、同文献では、ゲノム配列から推定されたPALと32%の相同性があった遺伝子配列を見出し、この配列を大腸菌に導入し、発現させて酵素活性を比較した結果、Tyrに対する活性が確認され、Pheにもわずかに活性が見られたことが開示されている。

[0007] 非特許文献４には、BLASTに登録されている遺伝子からTAL酵素遺伝子であると推定される46配列を選定し、大腸菌で発現を行ったところ、その中から5つのTAL酵素の活性測定に成功したことが開示されている。同文献には、特に、Chryseobacterium luteum sp nov由来のTAL酵素は非常に活性が高く、8時間の反応で2.03g/Lのクマル酸を生産することができたこと、また、Rivularia sp PCC7116由来のTAL酵素は24時間の反応で2.35g/Lのクマル酸を生産し、Pheにもわずかに作用することが開示されている。

先行技術文献

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Jaime Barros and Richard A. Dixon: Plant Phenylalanie/Tyrosine Ammonia-lyases. Trends in Plant Science, (2020) 25, 66-79

非特許文献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

非特許文献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

非特許文献4：Yannik Brack, Chenghai Sun, Dong Yi, Uwe T Bornscheuer: Discovery of Novel Tyrosine Ammonia Lyases for the Enzymatic Synthesi

s of p-Coumaric Acid. ChemBioChem. (2022) 23, e202200062

発明の概要

[0009] しかしながら、上記以外にも従来とは異なるアンモニアリアーゼが依然として求められている。

[0010] 本発明は、アンモニアリアーゼおよびその用途を提供することを一つの目的とする。

[0011] 本発明者らは、鋭意検討の結果、シュードモナス・クロロラフィス（Pseudomonas chlororaphis）由来のタンパク質がアンモニアリアーゼ活性を有することを見出した。本発明はこの知見に基づくものである。

[0012] 本発明の一つの態様によれば、配列番号１で表されるアミノ酸配列に対して８０％以上の配列相同性を有するアミノ酸配列を含んでなり、かつ、アンモニアリアーゼ活性を有するタンパク質が提供される。上記アンモニアリアーゼ活性としては、好ましくは、４－アミノフェニルアラニン－アンモニアリアーゼ活性、チロシン－アンモニアリアーゼ活性、ヒスチジン－アンモニアリアーゼ活性およびフェニルアラニン－アンモニアリアーゼ活性からなる群から選択される少なくとも１つの活性とされる。

[0013] 本発明の他の態様によれば、上記のタンパク質をコードする核酸、この核酸を含んでなるベクター、およびこの核酸もしくはベクターを発現可能な様式で含んでなる細胞が提供される。

[0014] 本発明の他の態様によれば、４－アミノ桂皮酸（４－ＡＣＡ）を製造する方法が提供され、該方法は、４－アミノフェニルアラニンを基質とする本発明のタンパク質による酵素反応を行う工程を含んでなる。

[0015] 本発明の他の態様によれば、ｐ－クマル酸を製造する方法が提供され、該方法は、チロシンを基質とする本発明のタンパク質による酵素反応を行う工程を含んでなる。

[0016] 本発明の他の態様によれば、４－イミダゾール－アクリル酸を製造する方法が提供され、該方法は、ヒスチジンを基質とする本発明のタンパク質による酵素反応を行う工程を含んでなる。

[0017] 本発明の他の態様によれば、桂皮酸を製造する方法が提供され、該方法は、フェニルアラニンを基質とする本発明のタンパク質による酵素反応を行う工程を含んでなる。

[0018] 本発明によれば、アンモニアリアーゼおよびその用途が提供される。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]図１は、４－アミノフェニルアラニンを基質として酵素反応を行ったときの４－アミノ桂皮酸（４－ＡＣＡ）の生成を示す図（クロマトグラム）である。上から反応前の反応液、大腸菌菌体と４－アミノ桂皮酸とを含む液、反応８時間後の反応液、反応３時間後の反応液を示す。反応前の反応液では、基質である４－アミノフェニルアラニンのピークが認められた。４－アミノ桂皮酸のピークは反応３時間後より反応８時間後の方がより大きく認められた。

[図2]図２は、ヒスチジンを基質として酵素反応を行ったときの４－イミダゾール－アクリル酸の生成を示す図（クロマトグラム）である。

発明の具体的説明

[0020] 本発明によれば、アンモニアリアーゼ活性を有するタンパク質が提供される。このアンモニアリアーゼによれば、４－アミノ桂皮酸（４－ＡＣＡ）を効率よく製造することが可能となる。また、このアンモニアリアーゼにより、ｐ－クマル酸を効率よく製造することも可能である。さらに、このアンモニアリアーゼにより、４－イミダゾール－アクリル酸を効率よく製造することも可能である。さらに、このアンモニアリアーゼにより、桂皮酸を効率よく製造することも可能である。

[0021] 本発明のタンパク質は、配列番号１で表されるアミノ酸配列に対して８０％以上、好ましくは９０％以上の配列相同性を有するアミノ酸配列を含んでなり、かつ、アンモニアリアーゼ活性を有するタンパク質である。上記アンモニアリアーゼ活性としては、好ましくは、４－アミノフェニルアラニン－アンモニアリアーゼ活性、チロシン－アンモニアリアーゼ活性、ヒスチジン－アンモニアリアーゼ活性およびフェニルアラニン－アンモニアリアーゼ活

性からなる群から選択される少なくとも１つの活性とされる。

[0022] 配列番号１は、シュードモナス・クロロラフィス（Pseudomonas chlororaphis）由来のタンパク質（ＰｃＨＡＬ３）のアミノ酸配列である。このアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は、配列番号２に示す。本発明は、配列番号１で表されるアミノ酸配列を有するＰｃＨＡＬ３だけでなく、配列番号１で表されるアミノ酸配列に対して８０％以上、好ましくは９０％以上の配列相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、ＰｃＨＡＬ３が示す活性のうちの少なくとも１つを有するタンパク質をも包含する。

[0023] 上記の活性のうち、４－アミノフェニルアラニン－アンモニアリアーゼ活性は、４－アミノフェニルアラニンを基質として４－アミノ桂皮酸（４－ＡＣＡ）を生成する活性である。また、チロシン－アンモニアリアーゼ活性は、チロシンを基質としてｐ－クマル酸を生成する活性である。また、ヒスチジン－アンモニアリアーゼ活性は、ヒスチジンを基質として４－イミダゾール－アクリル酸を生成する活性である。また、フェニルアラニン－アンモニアリアーゼ活性は、フェニルアラニンを基質として桂皮酸を生成する活性である。

[0024] 本発明の一つの実施態様によれば、本発明のタンパク質は、アンモニアリアーゼ活性を有するものとされる。本発明の他の一つの実施態様によれば、本発明のタンパク質は、４－アミノフェニルアラニン－アンモニアリアーゼ活性を有するものとされる。本発明の他の一つの実施態様によれば、本発明のタンパク質は、チロシン－アンモニアリアーゼ活性を有するものとされる。本発明の他の一つの実施態様によれば、本発明のタンパク質は、ヒスチジン－アンモニアリアーゼ活性を有するものとされる。本発明の他の一つの実施態様によれば、本発明のタンパク質は、フェニルアラニン－アンモニアリアーゼ活性を有するものとされる。

[0025] 本発明の好ましい実施態様によれば、本発明のタンパク質は、４－アミノフェニルアラニン－アンモニアリアーゼ活性およびチロシン－アンモニアリアーゼ活性を有するものとされ、さらに好ましくは４－アミノフェニルアラ

ニン－アンモニアリアーゼ活性、チロシン－アンモニアリアーゼ活性、ヒスチジン－アンモニアリアーゼ活性およびフェニルアラニン－アンモニアリアーゼ活性を有するものとされる。

[0026] ＰｃＨＡＬ３のアミノ酸配列（配列番号１）を、他の生物に由来するアンモニアリアーゼのアミノ酸配列と比較すると、配列番号１中の第９０残基にフェニルアラニン（Ｆ）残基が存在し、第９１残基にヒスチジン（Ｈ）残基が存在する点が、他のアンモニアリアーゼには見られない特徴であることが分かっている。タンパク質の３次元構造から、この第９０残基と第９１残基は基質認識部位であると考えられることから、ＰｃＨＡＬ３の特殊な基質特異性は、これらの残基に起因する可能性があると考えられる。従って、本発明の好ましい実施態様によれば、本発明のタンパク質のアミノ酸配列における、配列番号１中の第９０残基に相当する残基はフェニルアラニン（Ｆ）残基とされる。本発明のさらに好ましい実施態様によれば、本発明のタンパク質のアミノ酸配列における、配列番号１中の第９０残基に相当する残基はフェニルアラニン（Ｆ）残基とされ、配列番号１中の第９１残基に相当する残基はヒスチジン（Ｈ）残基とされる。

[0027] 本発明のタンパク質は、配列番号１で表されるアミノ酸配列に対して８０％以上、好ましくは８５％以上、より好ましくは９０％以上、さらに好ましくは９５％以上、さらに好ましくは９６％以上、さらに好ましくは９７％以上、さらに好ましくは９８％以上、さらに好ましくは９９％以上の配列相同性を有するアミノ酸配列を含む。ここで、アミノ酸配列の配列相同性は、当技術分野において公知のアルゴリズム、例えばＢＬＡＳＴＰ等を用いて、デフォルトの設定で特定することができる。

[0028] 本発明の特に好ましい実施態様によれば、本発明のタンパク質は、配列番号１で表されるアミノ酸配列を含むものとされる。

[0029] 本発明の核酸は、本発明のタンパク質（のアミノ酸配列）をコードするものである。核酸の種類は特に制限されるものではなく、ＤＮＡ、ＲＮＡ、あるいはこれらの組み合わせのいずれであってもよいが、好ましくはＤＮＡと

される。本発明の核酸は、本発明のタンパク質（のアミノ酸配列）をコードする限り、その具体的なヌクレオチド配列は特に制限されるものではないが、例えば、配列番号２で表されるヌクレオチド配列を含むものとされ、あるいは、配列番号２で表されるヌクレオチド配列に対して８０％以上、好ましくは８５％以上、好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上、さらに好ましくは９６％以上、さらに好ましくは９７％以上、さらに好ましくは９８％以上、さらに好ましくは９９％以上の配列相同性を有するヌクレオチド配列を含むものとされる。ここで、ヌクレオチド配列の配列相同性は、当技術分野において公知のアルゴリズム、例えばＢＬＡＳＴＮ等を用いて、デフォルトの設定で特定することができる。また、本発明の核酸は、宿主細胞に導入してその細胞の中で発現させることができ、その場合には、宿主細胞の種類に応じて、好ましいコドンを多く含むように設計してもよい。

[0030] 本発明のベクターは、本発明の核酸を含むものである。ベクターは、遺伝子などの発現用核酸構築物を宿主細胞中に導入するためのプラスミドであり、用いる宿主細胞の種類に応じて様々なものが知られている。本発明においても、用いる宿主細胞の種類に応じて適切なものを選択すればよい。また、本発明の核酸のベクター中への組み込みも、宿主細胞中で発現可能なように組み込めばよく、当業者であれば適切に行うことができる。例えば、宿主細胞が細菌等の原核生物の場合には、当該ベクターとして、宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組み込みが可能で、挿入された上記核酸を転写できる位置にプロモーターを含有しているものを用いることができる。例えば、当該ベクターを用いて、プロモーター、リボソーム結合配列、上記遺伝子、および転写終結配列からなる一連の構成を宿主細胞内で構築することできる。

[0031] 本発明の細胞は、本発明の核酸または本発明のベクターを発現可能な様式で含む細胞である。このような細胞は、用いる細胞の種類に応じて、上述のように構築されたベクターを用いて作製することができる。

[0032] 細胞（宿主細胞）の種類は特に制限されるものではなく、原核細胞および

真核細胞のいずれであってもよい。原核細胞の例としては、細菌、放線菌等が挙げられる。真核細胞の例としては、酵母、糸状菌、真核微細藻類、植物細胞、動物細胞等が挙げられる。本発明に用いられる細胞としては、その扱いやすさや発現効率等の理由から、細菌または酵母が好ましく、より好ましくは細菌、さらに好ましくは大腸菌が挙げられる。

[0033] 本発明によれば、本発明のタンパク質を利用した有用物質の製法が提供される。具体的には、

(i) ４－アミノ桂皮酸（４－ＡＣＡ）を製造する方法であって、４－アミノフェニルアラニンを基質とする本発明のタンパク質による酵素反応を行う工程を含んでなる方法；

(ii) ｐ－クマル酸を製造する方法であって、チロシンを基質とする本発明のタンパク質による酵素反応を行う工程を含んでなる方法；

(iii) ４－イミダゾール－アクリル酸を製造する方法であって、ヒスチジンを基質とする本発明のタンパク質による酵素反応を行う工程を含んでなる方法；および

(iv) 桂皮酸を製造する方法であって、フェニルアラニンを基質とする本発明のタンパク質による酵素反応を行う工程を含んでなる方法

が提供される。

[0034] 上記の酵素反応は、当業者に公知の方法によって行うことができ、例えば、本発明のタンパク質を発現している細胞（例えば細菌）を培養する際に、培地に基質を加えることによって行ってもよいし、本発明のタンパク質を発現している細胞または当該細胞の破砕液を基質溶液に添加して行ってもよいし、単離された本発明のタンパク質を基質溶液に添加して行ってもよいし、単離された本発明のタンパク質を固定化した支持体（カラムなど）に基質溶液を接触させることによって行ってもよい。その際の温度やｐＨの条件は、使用するタンパク質の酵素としての至適温度および至適ｐＨを参考に決定してもよいし、あるいは、発現細胞（例えば細菌）の培養に適した温度およびｐＨを参考に決定してもよい。本発明の好ましい実施態様によれば、酵素反

応に用いる本発明のタンパク質は、本発明の細胞によって供給されるものとされる。

[0035] 以下の表に、本明細書において言及される配列情報をまとめる。

[表1]

表１：配列情報

本発明のタンパク質のアミノ酸配列（配列番号１） MTTHPLEPVTFGELPLRIEDVLALANRQAPTRLQDDSAFRQRIAKGAQFLDSLLDKEGVIYGVTTGYGDSCVVAVPLQ HVEALPRHLYTFHGCGLGKLLDAQATRAVLAARLQSLCHGVSGVRVELLERLQAFLEHDILPLIPEEGSVGASGDLTP LSYVAATLSGEREVMFRGERRTSAEVHRELGWEPLVLRPKEALALMNGTAVMTGLACLAFARADYLLQLATRITALNV VALQGNPEHFDERLFAAKPHPGQMQVAAWLRQDLAIDAPTAPLHRLQDRYSLRCAPHVLGVLADSLGWLRGFIETELN SANDNPIIDAEAERVLHGGHFYGGHIAFAMDSLKNLVANVADLLDRQLALLVDERYNHGLPSNLSGAPADRAMINHGF KAVQIGTSAWTAEALKNTMPASVFSRSTECHNQDKVSMGTIAARDAIRVLELTEQVAAATLLAANQGVWLRGRAEDAR PLPPALAAMHQELAKDFPPVIEDRALEGELRLCLQRIAEQHWRLHA
本発明のタンパク質をコードするヌクレオチド配列（配列番号２） ATGACAACGCATCCATTGGAGCCTGTGACATTTGGCGAGTTACCCTTACGAATTGAGGATGTATTGGCTCTTGCTAAT CGCCAAGCCCCAACAAGATTACAAGATGATAGCGCATTTCGACAAAGAATTGCTAAGGGCGCTCAATTTCTTGATTCC CTCTTAGACAAGGAAGGTGTCATTTATGGAGTCACGACGGGATATGGGGATTCATGTGTGGTCGCAGTGCCTCTTCAA CATGTAGAGGCATTGCCTAGACATTTATATACGTTTCATGGCTGTGGGTTAGGAAAGTTATTGGATGCCCAAGCTACA CGCGCAGTGCTCGCAGCCCGCTTGCAAAGTCTTTGTCATGGGGTGAGTGGCGTGAGAGTGGAGTTATTGGAGCGCCTT CAAGCCTTTCTTGAGCATGATATTTTGCCCCTCATACCAGAGGAAGGATCAGTAGGAGCAAGCGGAGATCTCACACCA CTCAGCTATGTGGCAGCTACTTTAAGCGGCGAGCGAGAGGTCATGTTTCGCGGCGAGCGACGGACGAGTGCAGAGGTA CATCGGGAGCTTGGCTGGGAGCCCTTAGTGTTGAGACCAAAAGAGGCACTTGCCTTAATGAATGGGACAGCAGTGATG ACAGGCTTGGCTTGTTTGGCCTTTGCCCGCGCTGATTATTTACTTCAATTAGCTACAAGAATAACTGCATTGAATGTC GTGGCATTGCAAGGAAATCCAGAGCATTTTGATGAGCGGCTCTTTGCAGCAAAGCCTCATCCAGGCCAAATGCAAGTC GCTGCCTGGCTCCGGCAAGATCTTGCTATTGATGCACCTACGGCACCATTACATCGGCTCCAAGATCGGTATAGTCTC CGGTGTGCTCCTCATGTATTGGGAGTCTTAGCTGATAGTTTAGGCTGGCTTAGAGGATTTATAGAGACGGAGCTTAAT TCAGCTAATGATAATCCCATTATTGATGCTGAGGCAGAGCGCGTCCTTCATGGCGGCCACTTTTATGGCGGCCATATT GCCTTTGCAATGGATTCATTAAAGAATTTGGTCGCCAATGTCGCAGATCTTCTCGATCGCCAACTTGCACTCCTCGTG GATGAGCGATATAACCATGGCTTGCCATCAAATCTCAGCGGAGCCCCAGCTGATCGCGCTATGATTAATCATGGATTT AAGGCTGTGCAAATTGGCACTTCCGCATGGACGGCAGAGGCATTAAAGAATACTATGCCAGCAAGTGTCTTTAGCAGA AGCACGGAGTGTCATAATCAAGATAAGGTCAGTATGGGGACAATAGCAGCTCGGGATGCTATTCGCGTGCTTGAGCTT ACGGAGCAAGTGGCAGCAGCCACATTATTAGCCGCAAATCAAGGGGTGTGGCTTCGGGGCCGGGCAGAGGATGCCAGA CCACTTCCACCAGCATTGGCCGCCATGCATCAAGAGTTAGCCAAGGATTTTCCGCCTGTAATTGAGGATAGAGCCCTC GAGGGCGAGTTACGGTTGTGTTTACAACGGATAGCAGAGCAACATTGGCGCCTTCATGCATAA

実施例

[0036] 以下、実施例をもって本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例のみに限定されるものではない。

[0037] シュードモナス・クロロラフィス（Pseudomonas chlororaphis）由来のタンパク質（ＰｃＨＡＬ３。アミノ酸配列を配列番号１に、これをコードする

ヌクレオチド配列を配列番号２に示す）のアミノ酸配列を、他の生物に由来するアンモニアリアーゼのアミノ酸配列と比較したところ、配列番号１中の第９０残基にフェニルアラニン（Ｆ）残基が存在し、第９１残基にヒスチジン（Ｈ）残基が存在する点が、他のアンモニアリアーゼには見られない特徴であることが分かった。タンパク質の３次元構造から、この第９０残基と第９１残基は基質認識部位であると考えられることから、このタンパク質（ＰｃＨＡＬ３）は、他のアンモニアリアーゼとは異なる基質特異性を有する新規なアンモニアリアーゼである可能性があると考えられた。

[0038] そこで、本実施例では、上記のタンパク質（ＰｃＨＡＬ３）を宿主細胞における組換え発現により生合成し、そのアンモニアリアーゼ活性を調べた。宿主細胞としては、大腸菌（Escherichea coli）を用いた。

[0039] （１）４－アミノフェニルアラニンおよびヒスチジンを基質とする酵素活性

４－アミノフェニルアラニンおよびヒスチジンを基質として用いたときのＰｃＨＡＬ３の酵素活性を測定した。以下に、測定条件と測定結果を示す。

[0040] 測定条件

試薬：4-Amino Phenylalanine；

4-Amino Cinnamic Acid；

Histidine；

4-Imidazoleacrylic Acid。

反応液：10 mM 4APhe（100 mM Tris-HCl緩衝液 pH8.6）（基質液）

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

OD600が10になるように大腸菌をTris-HClで濃縮（具体的には、大腸菌を培養した培養液はOD600が約2-3であり、当該培養液を遠心して菌を沈降させて、最終的にOD600が10になるようにTris-HClを加えた。）

反応条件：10 mM 4APheの基質液または10 mM Hisの基質液にＰｃＨＡＬ３を発現した上記大腸菌の菌体を添加した反応液を用いて、37℃、3-8時間、反応を行った。（ヒスチジンを基質とした場合、反応は３時間行い、４－アミノフェニルアラニンを基質とした場合、反応は２回行い、反応時間はそれぞれ

３時間および８時間とした。）

撹拌速度：450 rpm

サンプル調製：遠心分離により菌を除去し、上清を測定。

HPLC： カラム：C18（4.6 x 150mm/4.6 x 250mm）。

移動相：A：20mM リン酸カリウム緩衝液；

B：メタノール。

流速：0.8 ml／分

プログラム：2%メタノール7min→50%メタノールまで5minでグラジエント→98%メタノールまで2min→4min維持後終了

検出：280 nm/210nm

サンプル量：5 μl

[0041] 結果

結果を図１および図２に示す。これらの図から、４－アミノフェニルアラニンを基質として用いたときは４－アミノ桂皮酸（４－ＡＣＡ）が効率よく生成し、ヒスチジンを基質として用いたときは４－イミダゾール－アクリル酸が効率よく生成することが分かった。

[0042] （２）フェニルアラニンおよびチロシンを基質とする酵素活性

フェニルアラニンおよびチロシンを基質として用いたときのＰｃＨＡＬ３の酵素活性を測定した。以下に、測定条件と測定結果を示す。

[0043] 測定条件

試薬：Phenylalanine；

Cinnamic Acid；

Tyrosine；

p-Coumaric Acid。

反応液：10 mM フェニルアラニン（100mM Tris-HCl緩衝液 pH8.5）（基質液）

1 mM チロシン（70mM ピロリン酸ナトリウム緩衝液 pH9.3）（基質液）

OD600が10になるように大腸菌を緩衝液で濃縮。

反応条件：10 mM フェニルアラニンの基質液または1 mM チロシンの基質液にＰｃＨＡＬ３を発現した上記大腸菌の菌体を添加した反応液を用いて、37℃、１時間、反応を行った。

撹拌速度：450 rpm

サンプル調製：遠心分離により菌を除去し、上清を測定。

HPLC： カラム：C18（4.6 x 150mm/4.6 x 250mm）。

移動相：A：20mM リン酸カリウム緩衝液；

B：メタノール。

流速：0.8 ml／分

プログラム：2%メタノール7min→50%メタノールまで5minでグラジエント→98%メタノールまで2min→4min維持後終了

検出：280 nm

サンプル量：5 μl

[0044] 結果

[表2]

表２：酵素活性

基質→生成物	生産量	収率
フェニルアラニン→桂皮酸	0.16 mM	1.6 %
チロシン→ｐ－クマル酸	0.64 mM	64.0 %

[0045] 上記の表から、フェニルアラニンを基質として用いたときは桂皮酸が効率よく生成し、チロシンを基質として用いたときはｐ－クマル酸が効率よく生成することが分かった。

請求の範囲

[請求項1] 配列番号１で表されるアミノ酸配列に対して８０％以上の配列相同性を有するアミノ酸配列を含んでなり、かつ、アンモニアリアーゼ活性を有する、タンパク質。

[請求項2] 配列番号１で表されるアミノ酸配列に対して９０％以上の配列相同性を有するアミノ酸配列を含んでなり、かつ、アンモニアリアーゼ活性を有する、タンパク質。

[請求項3] 前記アンモニアリアーゼ活性が、４－アミノフェニルアラニン－アンモニアリアーゼ活性、チロシン－アンモニアリアーゼ活性、ヒスチジン－アンモニアリアーゼ活性およびフェニルアラニン－アンモニアリアーゼ活性からなる群から選択される少なくとも１つの活性である、請求項１または２に記載のタンパク質。

[請求項4] 配列番号１中の第９０残基に相当する残基がフェニルアラニン（Ｆ）残基である、請求項１に記載のタンパク質。

[請求項5] 配列番号１中の第９０残基に相当する残基がフェニルアラニン（Ｆ）残基であり、配列番号１中の第９１残基に相当する残基がヒスチジン（Ｈ）残基である、請求項１に記載のタンパク質。

[請求項6] ４－アミノフェニルアラニン－アンモニアリアーゼ活性およびチロシン－アンモニアリアーゼ活性を有する、請求項１に記載のタンパク質。

[請求項7] ４－アミノフェニルアラニン－アンモニアリアーゼ活性、チロシン－アンモニアリアーゼ活性、ヒスチジン－アンモニアリアーゼ活性およびフェニルアラニン－アンモニアリアーゼ活性を有する、請求項１に記載のタンパク質。

[請求項8] 配列番号１で表されるアミノ酸配列を含んでなる、請求項１に記載のタンパク質。

[請求項9] 請求項１に記載のタンパク質をコードする、核酸。

[請求項10] 請求項７に記載の核酸を含んでなる、ベクター。

[請求項11] 請求項９に記載の核酸または請求項１０に記載のベクターを発現可能な様式で含んでなる、細胞。

[請求項12] ４－アミノ桂皮酸（４－ＡＣＡ）を製造する方法であって、４－アミノフェニルアラニンを基質とする請求項１に記載のタンパク質による酵素反応を行う工程を含んでなる、方法。

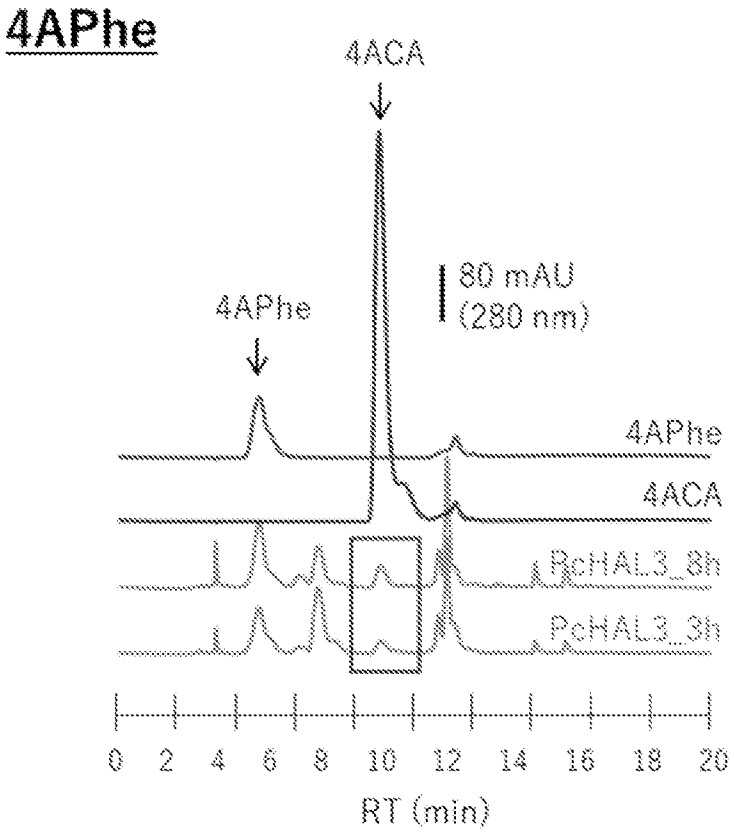
[請求項13] ｐ－クマル酸を製造する方法であって、チロシンを基質とする請求項１に記載のタンパク質による酵素反応を行う工程を含んでなる、方法。

[請求項14] ４－イミダゾール－アクリル酸を製造する方法であって、ヒスチジンを基質とする請求項１に記載のタンパク質による酵素反応を行う工程を含んでなる、方法。

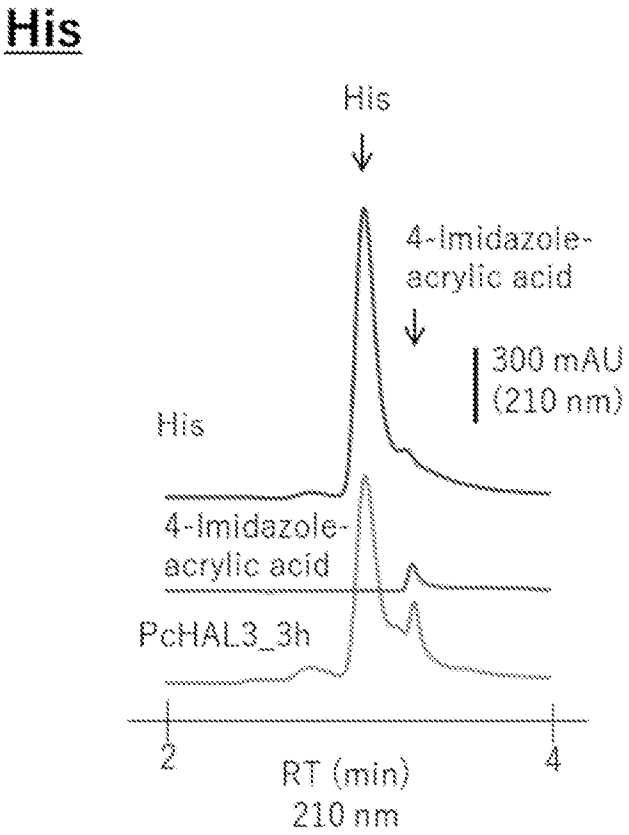
[請求項15] 桂皮酸を製造する方法であって、フェニルアラニンを基質とする請求項１に記載のタンパク質による酵素反応を行う工程を含んでなる、方法。

[請求項16] 前記タンパク質が、請求項１１に記載の細胞によって供給されるものである、請求項１２～１５のいずれか一項に記載の方法。

[図1]


4APhe
4ACA
4APhe
80 mAU
(280 nm)
4APhe
4ACA
PcHAL3_8h
PcHAL3_3h
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20
RT (min)

[図2]


His
His
4-Imidazole-
acrylic acid
300 mAU
(210 nm)
His
4-Imidazole-
acrylic acid
PcHAL3_3h
2
4
RT (min)
210 nm

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/033555

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/60(2006.01)i; ***C07D 233/64***(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 9/88***(2006.01)i; ***C12N 15/63***(2006.01)i; ***C12P 7/40***(2006.01)i; ***C12P 17/10***(2006.01)i
FI: C12N15/60; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/63 Z; C12P7/40; C12P17/10; C07D233/64; C12N9/88 ZNA

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/60; C07D233/64; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N9/88; C12N15/63; C12P7/40; C12P17/10

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 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

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.
X	histidine ammonia-lyase [Pseudomonas chlororaphis]. Database GenBank [online]. 31 July 2014 uploaded, [retrieved on 11 October 2024], Retrieved from the internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AIC17634>, Accession No. AIC17634 entire text	1-11, 14, 16
Y		1-16
X	aromatic amino acid lyase [Pseudomonas chlororaphis]. Database GenBank [online]. 14 April 2021 uploaded, [retrieved on 11 October 2024], Retrieved from the internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/MBP5061072>, Accession No. MBP5061072 entire text	1-8
Y		1-16
Y	JP 2016-516428 A (CODEXIS, INC.) 09 June 2016 (2016-06-09) paragraph [0003]	1-16

☑ 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
11 October 2024	**29 October 2024**

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.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2018-516080 A (EVOLVA SA.) 21 June 2018 (2018-06-21) paragraph [0009]	1-16
Y	US 2017/0166936 A1 (DANMARKS TEKNISKE UNIVERSITET) 15 June 2017 (2017-06-15) paragraph [0003]	1-16
Y	BRACK, Yannik et al. Discovery of Novel Tyrosine Ammonia Lyases for the Enzymatic Synthesis of p-Coumaric Acid. ChemBioChem. 07 April 2022, vol. 23, no. 10, pp. 1-7, DOI: 10.1002/cbic.202200062 abstract, p. 2, fig. 3, 4	1-16
A	JP 2014-117272 A (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KOBE UNIVERSITY) 30 June 2014 (2014-06-30) entire text	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/033555

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/JP2024/033555

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2016-516428 A	09 June 2016	US 2014/0314843 A1 paragraph [0004]	
		WO 2014/172541 A2	
		EP 2986722 A2	
		CA 2909719 A1	
		KR 10-2015-0143816 A	
		CN 105324483 A	
JP 2018-516080 A	21 June 2018	US 2018/0163235 A1 paragraph [0009]	
		WO 2016/189121 A1	
		EP 3303601 A1	
		CA 2987508 A1	
		CN 107849591 A	
US 2017/0166936 A1	15 June 2017	WO 2016/008886 A1	
		EP 3169791 A1	
JP 2014-117272 A	30 June 2014	(Family: none)	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/033555

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N 15/60(2006.01)i; C07D 233/64(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 9/88(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12P 7/40(2006.01)i; C12P 17/10(2006.01)i
FI: C12N15/60; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/63 Z; C12P7/40; C12P17/10; C07D233/64; C12N9/88 ZNA

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））

C12N15/60; C07D233/64; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N9/88; C12N15/63; C12P7/40; C12P17/10

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	１９７１－２０２４年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２４年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２４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
X	"histidine ammonia-lyase [Pseudomonas chlororaphis]", Database GenBank [online], 2014.07.31 uploaded, [retrieved on 2024.10.11], Retrieved from the internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AIC17634>, Accession No. AIC17634 全文	1-11,14,16
Y		1-16
X	"aromatic amino acid lyase [Pseudomonas chlororaphis]", Database GenBank [online], 2021.04.14 uploaded, [retrieved on 2024.10.11], Retrieved from the internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/MBP5061072>, Accession No. MBP5061072 全文	1-8
Y		1-16

☑ 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
11.10.2024	29.10.2024

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）
團野　克也 4B 5279
電話番号 03-3581-1101 内線 3488

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	JP 2016-516428 A (コデクシス, インコーポレイテッド) 09.06.2016 (2016-06-09) [0003]	1-16
Y	JP 2018-516080 A (エヴォルヴァ エスアー.) 21.06.2018 (2018-06-21) [0009]	1-16
Y	US 2017/0166936 A1 (DANMARKS TEKNISKE UNIVERSITET) 15.06.2017 (2017-06-15) [0003]	1-16
Y	BRACK, Yannik et al., "Discovery of Novel Tyrosine Ammonia Lyases for the Enzymatic Synthesis of p-Coumaric Acid", ChemBioChem, 2022.04.07, Vol. 23, No. 10, p. 1-7, DOI: 10.1002/cbic.202200062 Abstract, p. 2, Fig. 3,4	1-16
A	JP 2014-117272 A (国立大学法人神戸大学) 30.06.2014 (2014-06-30) 全文	1-16

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/033555

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/JP2024/033555

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2016-516428 A	09.06.2016	US 2014/0314843 A1 [0004] WO 2014/172541 A2 EP 2986722 A2 CA 2909719 A1 KR 10-2015-0143816 A CN 105324483 A	
JP 2018-516080 A	21.06.2018	US 2018/0163235 A1 [0009] WO 2016/189121 A1 EP 3303601 A1 CA 2987508 A1 CN 107849591 A	
US 2017/0166936 A1	15.06.2017	WO 2016/008886 A1 EP 3169791 A1	
JP 2014-117272 A	30.06.2014	（ファミリーなし）	