

# 公告本

## 發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：96143148

※申請日期：96.11.15

※IPC 分類：A61K38/46  
C12N15/31

C12N15/09

C12R1/19

### 一、發明名稱：(中文/英文)

具有碎葉鬼傘脯胺酸寡胜肽酶活性之蛋白質、編碼該蛋白質之核酸序列、生產該蛋白質之方法及其應用

### 二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

財團法人食品工業發展研究所

代表人：(中文/英文)

劉廷英

住居所或營業所地址：(中文/英文)

300 新竹市食品路331號

國籍：(中文/英文)

中華民國

### 三、發明人：(共 4 人)

姓名：(中文/英文)

1. 陳任道

2. 趙梅琳

3. 溫秋燕

4. 朱文深

國籍：(中文/英文)

1. 2. 3. 4. 皆中華民國

#### 四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項  第一款或  第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

## 五、中文發明摘要：

本發明係關於一種具有碎葉鬼傘脯胺酸寡胜肽酶活性之蛋白質；本發明亦相關於編碼該蛋白質之核酸序列，以及生產該蛋白質之生產方法，該方法包括自碎葉鬼傘 (*Coprinus clastophyllus*) 中分離出編碼前述蛋白質之基因並用以生產該蛋白質，且以該蛋白質可進行製造醫藥組成物等相關應用。

## 六、英文發明摘要：

**七、指定代表圖：**

(一)本案指定代表圖為：第(一)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

**八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：**

無

## 九、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種具有脯胺酸寡胜肽酶活性之蛋白質及其基因、生產方法與應用，尤關於一種具有碎葉鬼傘之脯胺酸寡胜肽酶活性之蛋白質及其基因、生產方法與應用。

### 【先前技術】

脯胺酸寡胜肽酶 (prolyl oligopeptidase) (EC 3.4.21.26); 也稱為脯胺酸內切胜肽酶 (prolyl endopeptidase) 或切脯胺酸後酶 (post-proline cleaving enzyme), 能夠水解含脯胺酸之胜肽, 其作用位置是在脯胺酸之羧基端 (carboxyl side) (Polgár, 1994; Polgár, 2002)。

脯胺酸寡胜肽酶近來應用性研究很廣泛, 一方面是脯胺酸寡胜肽酶能降解許多與記憶及學習有關的胜肽, 被認為與記憶喪失症 (amnesia) (如帕金森氏症 (Parkinsonism)) 有關, 所以有研究尋找其抑制劑以作為治療 (Yoshimoto *et al.*, 1987; Atack *et al.*, 1991; Marighetto *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2004; Sorensen *et al.*, 2004; Atta-ur-Rahman *et al.*, 2005; Jarho *et al.*, 2005); 另一方面研究脯胺酸寡胜肽酶應用在解決因富含脯胺酸 (proline) 之麩質 (gluten) 所引起之腹瀉 (celiac disease) (Piper *et al.*, 2004; Marti *et al.*, 2005; Matysiak-Budnik *et al.*, 2005; Pyle *et al.*, 2005; Gass *et al.*, 2005;); 或用以純化回

97年3月11日修(更)正替換頁

收異源性表現胜肽酶(Xiu *et al.*, 2002)；另外也有應用在治療癌症上的研究使藥物先以前體藥物(prodrug)存在，減少對正常細胞的傷害，經脯胺酸寡胜肽酶作用後成為有功效的藥物(Heinis *et al.*, 2004)。

脯胺酸寡胜肽酶存在動物、植物及微生物，但活性普遍不高。微生物方面脯胺酸寡胜肽酶曾在腦膜炎敗血黃桿菌(*Flavobacterium meningosepticum*) (0.30 U/ml ; Yashimoto *et al.*, 1980)、乳酸菌(*Lactobacillus casei*) (0.15 U/g ; Habibi-Najafi and Lee, 1994)、費氏丙酸桿菌(*Propionibacterium freudenreichii*) (4.3 mU/ml ; Tobiassen *et al.*, 1996)、洋菇(*Agaricus bisporus*)發酵液(0.15 U/ml ; Abdus Sattar *et al.*, 1990)、黃單胞菌(*Xanthomonas* spp.) (0.15 U/ml ; Szwajcer-Dey *et al.*, 1992)中被發現。

以基因工程方式將脯胺酸寡胜肽酶基因選殖(cloning)後以大腸桿菌(*Eschericia coli*, *E. coli*)等作為宿主細胞，進行異源性大量表現可提高酶活性，如莢膜鞘單胞菌(*Sphingomonas capsulata*)在大腸桿菌中表現脯胺酸寡胜肽酶活性(0.2 U/ml)比原始母株高約七倍(Yoshimoto *et al.*, 1998)；腦膜炎敗血黃桿菌之脯胺酸寡胜肽酶基因在大腸桿菌中表現最高可得 0.7 U/ml (Diefenthal *et al.*, 1993)，Uchiyama 等人將腦膜炎敗血黃桿菌之脯胺酸寡胜肽酶重新構築在大腸桿菌表現之活性最高可得 8.1 U/ml，純化後其比活性可高達 124 U/mg (Uchiyama *et al.*, 2000)；

嗜水氣單胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 脯胺酸寡胜肽酶基因在大腸桿菌中表現為原始母株 100 倍 (1.48 U/ml)，純化後其比活性為 8.8 U/mg (Kanatani *et al.*, 1993)；斑點氣單胞菌 (*Aeromonas punctata*) 脯胺酸寡胜肽酶基因在大腸桿菌中表現為原始母株 112 倍，純化後其比活性為 67 U/mg (Li *et al.*, 2000)。

另外，極端嗜熱厭氧古菌 (*Pyrococcus furiosus*) 脯胺酸寡胜肽酶基因在大腸桿菌中表現後純化之比活性為 232 U/mg (但其活性定義與前述各相關研究所使用之定義有相當大的不同，為每分鐘使 OD<sub>410</sub> 吸光值產生 0.1 的改變即為 1U, Harwood *et al.*, 1997) 及 4 U/mg (Harwood and Schreier, 2001)。

以上各例顯示出利用大腸桿菌表現脯胺酸寡胜肽酶基因並加以純化，確可提高其活性。然而各種脯胺酸寡胜肽酶分別適合不同的反應條件。在適合之反應條件下方可充分發揮其活性，而在不適合之反應條件下則僅能發揮部分活性。一般而言，活性高，且其所適用之環境條件貼近實際應用的環境條件之脯胺酸寡胜肽酶，比較具有應用潛力。而在評價其應用潛力時，通常觀察其反應最適溫度及最適 pH 值，而其適用範圍之寬窄，則視其於非最適環境條件下保有之活性比例高低，並測量其受熱後所餘之活性，以知其熱安定性。

就前揭各脯胺酸寡胜肽而言，嗜水氣單胞菌之脯胺酸寡胜肽酶之最適溫度為 30°C，最適 pH 為 8.0，在 42°C 預熱

30 分鐘時活性會減少 50%；斑點氣單胞菌之脯胺酸寡胜肽酶之最適溫度為 34°C，最適 pH 為 8.4；腦膜炎敗血黃桿菌之脯胺酸寡胜肽酶最適 pH 為 7.0，最適反應溫度為 40°C，在 42°C 預熱 15 分鐘活性會減少 50% (Yashimoto *et al.*, 1980)，而經易錯 PCR(error-prone PCR)突變後之脯胺酸寡胜肽酶在 60°C 預熱 1 小時後活性(於 pH7.0, 30°C 測定)會減少 50%(Uchiyama *et al.*, 2000)。目前利用大腸桿菌表現脯胺酸寡胜肽酶基因所得脯胺酸寡胜肽酶之中，以腦膜炎敗血黃桿菌之脯胺酸寡胜肽酶比活性最高，且經易錯 PCR 突變後其耐熱性也最佳。但腦膜炎敗血黃桿菌之為一株病原菌，在應用上有所疑慮，而其他的脯胺酸寡胜肽酶則有耐熱性不佳的缺點。

然而，由於生物體種類繁多，找出適當之生物體，並從生物體中分離純化出具有所需性質之脯胺酸寡胜肽酶，具有相當之困難，非本發明所屬技術領域中具有通常知識者可輕易得知或思及。例如，以往針對黑麴菌(*Aspergillus niger*)進行研究而最初篩選到之脯胺酸寡胜肽酶，其後經序列比對發現應屬另一種絲胺酸蛋白酶 (serine protease)，而非脯胺酸寡胜肽酶；而到目前為止，在真菌中之絲狀真菌，尚未曾發現具有脯胺酸寡胜肽酶者，僅曾經在擔子菌中發現具有脯胺酸寡胜肽酶之真菌，目前也未見將真菌之脯胺酸寡胜肽酶在大腸桿菌中大量表現的案例。

有鑒於前述脯胺酸寡胜肽酶種類不足，而難以配合不



同應用條件之問題，本發明之目的在於提供一種具有優異的脯胺酸寡胜肽酶活性，且耐熱性較佳的蛋白質及其基因、生產方法與應用。

### 【發明內容】

本發明之發明人經研究及努力，終於自碎葉鬼傘 (*Coprinus clastophyllus*) 中，分離出可達成本發明目的之脯胺酸寡胜肽酶及其基因與生產方法。

為達成上述目的，本發明提供一種經分離的蛋白質，該蛋白質具有脯胺酸寡胜肽酶之活性，其係選自由下列組成之群

(a) 具有胺基酸序列 SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:10 之蛋白質；

(b) 由具有序列 SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:9 之核酸序列所編碼之蛋白質；

(c) 具有與蛋白質 (a) 或 (b) 之胺基酸序列序列相似性大於 60% 的胺基酸序列，且具有同一活性之蛋白質。

其中由於胺基酸序列之變異並不必然影響其構成蛋白質之活性，因此只要該胺基酸序列之變異不影響該蛋白質之活性，仍屬於本發明之範圍。

本發明亦提供一種經分離的核酸，其係選自由下列組成之群：

(a) 編碼具有前述蛋白質之核酸；

(b) 具有序列 SEQ ID NO:5 之核酸；

(c) 具有與核酸(b)之核酸序列的序列相似性大於60%，且編碼具有同一活性之蛋白質之核酸；

(d) 具有序列 SEQ ID NO:9 之核酸；

(e) 具有與核酸(d)之核酸序列的序列相似性大於60%之核酸序列，且編碼具有同一活性之蛋白質之核酸；

(f) 與核酸(a)至(e)編碼具有相同胺基酸序列的蛋白質之核酸；

(g) 核酸(a)至(f)之反義核酸。

其中由於核酸序列之變異並不必然影響本發明所提供之序列編碼蛋白質之活性，因此只要在核酸序列之變異不影響該蛋白質之活性，仍屬於本發明之範圍。

本發明提供一種核酸探針，其係可藉由下列高度嚴格條件與前述之核酸雜合：

(a) 在 FastHyb 溶液中於 50°C 下反應 16 小時；

(b) 以適量 2 X SSC, 0.1 % SDS 溶液於室溫下沖洗五分鐘；

(c) 反覆前述步驟(b)一次；

(d) 以 0.5 X SSC, 0.1 % SDS 溶液於 65 °C 下充分作用 15 分鐘；

(e) 反覆前述步驟(d)一次。

本發明提供一種具有前述核酸之嵌合基因，其係可操作的連結到一驅動子，而該驅動子可將該嵌合基因於一細胞中加以驅動表現。

一種核酸構築體，其包括前述之核酸，且該核酸係可

操作地連接到控制序列，而該控制序列能夠在特定細胞中驅動該核酸所編碼的蛋白。

本發明提供一種載體，其包括有前述之核酸或前述之核酸構築體。

本發明提供一種轉形株(transformant)，其包括有前述之載體。

前述之轉形株，其係一 BL21(DE3) 大腸桿菌菌株。

前述之轉形株，其係一 DH10B 大腸桿菌菌株。

本發明提供一種具有解決因富含脯胺酸之麩質所引起腹瀉之功能的醫藥組成物，其含有前述之蛋白質作為有效成分，並含有醫藥上可接受之賦形劑。

本發明提供一種組成物，其含有一前體藥物、一醫藥上可接受之賦形劑與如申請專利第 1 項所述之蛋白質，該蛋白質係作為有效成分以處理該前體藥物而使其成為一有功效藥物。

本發明提供一種使用申請專利第 1 項所述之蛋白質之應用，其係用於製造純化回收異源性表現胜肽之回收處理劑。

本發明提供一種生產具有脯胺酸寡胜肽酶活性之蛋白質之方法，其包括有以下步驟：

(a) 提供前述轉形株；

(b) 在可令具有脯胺酸寡胜肽酶活性之蛋白質被表現之環境下培養該轉形株；及

(c) 進行純化以獲取該蛋白質。

由上述可知本發明所提供碎葉鬼傘脯胺酸寡胜肽酶之性質及其基因序列與生產方法之實施步驟，藉由該脯胺酸寡胜肽酶之性質，其所適用之範圍恰可彌補既有脯胺酸寡胜肽酶適用範圍之不足，具有更優秀之應用潛力；另一方面，藉由本發明所提供脯胺酸寡胜肽酶基因，可有效的利用前述之生產方法加以生產以供應用。

## 【實施方式】

### 辭彙定義

相同度 (Identity)：術語「相同度」於本文定義為二核酸序列之間或二胺基酸序列之間相互不歧異的程度。在本說明書中該相同度係採用基礎區域排比搜尋工具 (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST) 程式測出 Identity 之讀值。

相似度 (Similarity)：術語「相似度」於本文定義為二序列之間相關連的程度，其可以序列間相同比率及/或保留比率定之。在本說明書中該相同度係採用基礎區域排比搜尋工具 (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST) 程式測出 Similarity 之讀值。

嵌合基因 (chimeric gene)：術語「嵌合基因」於本文定義為攜帶來自不同來源之核酸之重組核酸形成之基因。例如來自相互無關之不同基因之核酸組成者，或由來自一基因的一部分片段與另一基因的一部分片段以重組技術形成者。

控制序列(controlling sequence)：術語「控制序列」於本文定義為一種能使一基因之核酸序列啟動或關閉，從而影響該基因核酸序列表現之序列；例如該控制序列可為一驅動子或一編碼訊號胜肽(signal peptide)之序列。

載體(vector)：術語「載體」於本文定義為一種用以轉移一核酸進入一宿主細胞之物，例如質體、噬菌體和其他病毒等。該載體亦可為一表現載體，其可例行地接受諸如具有重組核酸序列之核酸，並在將該核酸送入該宿主細胞之後，引起該核酸之核酸序列表現。其中載體與宿主細胞在配對使用上，係典型地根據載體與宿主細胞之間的相容性加以選擇。又，該載體可為線性或封閉環狀之核酸所構成之質體。

### 發明詳述

由於脯胺酸寡胜肽酶如前述與記憶學習相關胜肽之降解、以及富含脯胺酸之麩質所引起之腹瀉均有所關聯，且可用以純化回收異源性表現胜肽，或作用於前體藥物使之形成有效藥物，因此具有相當之研究與應用價值。

本發明提供具有碎葉鬼傘脯胺酸寡胜肽酶活性之蛋白質及其基因序列與生產方法之相關數據與具體實施步驟。本發明之具有脯胺酸寡胜肽酶活性之蛋白質所適用之範圍恰可彌補既有脯胺酸寡胜肽酶適用範圍之不足，而該脯胺酸寡胜肽酶更具有極高之活性而具有更優秀之應用潛力；另一方面，可有效的利用本發明所提供分離自碎葉鬼傘之

脯胺酸寡胜肽酶基因，以本發明所揭露之生產方法並進行製造醫藥組成物等相關應用。

又，藉由本發明提供之具有碎葉鬼傘脯胺酸寡胜肽酶活性之蛋白質，可用以製造醫藥組成物以解決因富含脯胺酸之麩質所引起腹瀉、或處理前體藥物使之成為有功效藥物；亦可用以製造能純化回收異源性表現胜肽之回收處理劑。

除此之外，本發明亦揭露了相關之核酸、載體及轉形株以作為生產與進一步研究之用。

根據本發明可作之不同修正及變化，以及所生產之脯胺酸寡胜肽酶在濃度數據或活性數據之小幅差距等，對於熟悉該項技術者而言均顯然不會偏離本發明的範圍與精神。雖然本發明已敘述特定的較佳具體事實，必須瞭解的是本發明不應被不當地限制於該等特定具體事實上。在實施本發明之已述模式方面，對於熟習該項技術者而言，諸如採用不同的既有生物學方法或其他所屬技術領域中的習知技術等，均屬於顯而易知之不同修正而同樣的被涵蓋於本文之申請專利範圍之內。

### 蛋白質

本發明係相關一種經分離且具有脯胺酸寡胜肽酶活性之蛋白質。為了提高脯胺酸寡胜肽酶之活性，在本發明中由原先所篩選到含有熱安定性較佳的脯胺酸寡胜肽酶(胞外活性 0.03 U/ml)的碎葉鬼傘菌株(財團法人食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心，編號 BCRC 36074)中，選

殖出脯胺酸寡胜肽酶之 cDNA，並將其利用大腸桿菌作為宿主細胞以大量表現而獲取該蛋白質。

若定義在 pH 為 7.0，反應溫度為 45 °C 之條件下，每分鐘產生 1 微莫耳 ( $\mu\text{mole}$ ) 重氮化對硝基苯胺之脯胺酸寡胜肽酶活性為 1 U，則該具有脯胺酸寡胜肽酶活性之蛋白質之活性在大腸桿菌菌株中於胞內所表現之脯胺酸寡胜肽酶活性為 7.0 U/ml 至 8.0 U/ml，更佳的是 7.2 U/ml 至 7.7 U/ml，最佳的是 7.2 U/ml 與 7.7 U/ml；將該蛋白質純化後，其比活性為 55.0 U/mg 至 70.0 U/mg，更佳的是 56.1 U/mg 至 66.8 U/mg，最佳的是 56.1 U/mg 與 66.8 U/mg。

又，該蛋白質最適反應 pH 為 pH6 至 pH8，更佳的是 pH6 至 pH7，最佳的是 pH7。其於 pH7 之最適反應溫度係 45°C，而其於 pH8 之最適反應溫度係 37°C，且在受到未達 55°C 之短時間預熱時，仍保有相當之脯胺酸寡胜肽酶活性。

該蛋白質，較佳的是一種具有胺基酸序列 SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:10 之蛋白質，或由具有序列 SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:9 之核酸所編碼之蛋白質。又，該蛋白質具有與前述胺基酸序列 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:10、或由 SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:9 編碼之胺基酸序列之序列相似性大於 60% 以上的胺基酸序列，且具有同一活性；較佳的是上述序列相似度較佳是 70% 以上，較佳的是上述序列相似度較佳是 80% 以上，更佳的是上述序列相似度較佳是 90% 以上，最佳的是上述序列相似度較佳是 95% 以上。即使胺基酸序列之間有所變異，其蛋白質仍可能發揮本發明所提供脯胺酸寡胜

肽酶之活性；因此所屬領域中具有通常知識者可以理解：只要序列之變異不影響該蛋白質之功能或活性，仍屬於本發明之範圍。

再者，該蛋白質係由具有與序列 SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:9 的序列相似性大於 60%之核酸所編碼，且與前述蛋白質具有同一功能之蛋白質。

另外，該蛋白質係由一核酸所編碼，該核酸係可藉由：在 FastHyb 溶液中於 50°C 下反應 16 小時；以適量 2 X SSC, 0.1 % SDS 溶液於室溫下沖洗五分鐘；如前一步驟再反覆沖洗一次；以 0.5 X SSC, 0.1 % SDS 溶液於 65 °C 下充分作用 15 分鐘；如前一步驟再反覆作用一次；之高度嚴格條件而得以與具有序列 SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:9 之核酸雜合之核酸，且該蛋白質與前述本發明之蛋白質具有同一功能。

#### 核酸

本發明亦相關於一種經分離之核酸，其具有編碼前述本發明蛋白質之核酸序列。該核酸係編碼具有前述蛋白質之核酸，較佳的是，其係具有序列 SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:9 之核酸，或是具有與序列 SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:9 之序列相似性大於 60%之核酸序列，且編碼具有同一活性之蛋白質之核酸，皆屬於本發明涵蓋之範圍；較佳的是上述序列相似度較佳是 70%以上，較佳的是上述序列相似度較佳是 80%以上，更佳的是上述序列相似度較佳是 90%以上，最佳的是上述序列相似度較佳是 95%以上。



其中，序列 SEQ ID NO:5 與 SEQ ID NO:9 之間以及上述為本發明所涵蓋之核酸序列之間雖有變異，但其所編碼具有如前述 SEQ ID NO:6 及 SEQ ID NO:10 等胺基酸序列或與之具有相當序列相似性之胺基酸序列的蛋白質均能發揮前述脯胺酸寡胜肽酶之功能，因此只要序列之變異不影響其所編碼蛋白質之功能或活性，仍屬於本發明之範圍。

又，與前述核酸編碼具有相同胺基酸序列的蛋白質之核酸，以及前述核酸之反義核酸，對所屬領域中具有通常知識者而言並不會偏離本發明之範圍，仍屬於本發明之範圍。

#### 核酸探針 (probe)

本發明亦相關於一種核酸探針，其係可藉由：在 FastHyb 溶液中於 50°C 下反應 16 小時；以適量 2 X SSC, 0.1 % SDS 溶液於室溫下沖洗五分鐘；如前一步驟再反覆沖洗一次；以 0.5 X SSC, 0.1 % SDS 溶液於 65 °C 下充分作用 15 分鐘；如前一步驟再反覆作用一次；之高度嚴格條件而得以與前述之核酸雜合。

#### 嵌合基因

本發明亦相關於一種具有前述核酸之嵌合基因，其係可操作的連結到一驅動子，而該驅動子可將該嵌合基因於一細胞中加以驅動表現。為研究或商業上之應用而將一核酸配合其他之核酸組合成嵌合基因以達其應用之目的，係為所屬技術領域中具有通常知識者可充份理解而能配合需要實施者。

### 核酸構築體 (construct) 及載體

本發明亦相關於一種核酸構築體，其包括前述之核酸，且該核酸係可操作地連接到一控制序列，而該控制序列至能夠在特定細胞中驅動該核酸所編碼的蛋白質。該等核酸構築體，例如重組質體，在研究或商業上均有多種應用，以一核酸構築一核酸構築體係為所屬技術領域中具有通常知識者可充份理解而能配合需要實施者。

又，本發明亦相關於一種載體，該載體係包括有前述本發明所相關之核酸或前述核酸構築體。

### 轉形株

本發明亦相關於一種轉形株 (transformant)，其係一接受前述本發明所相關之核酸而被轉形之宿主細胞。該宿主細胞可為一大腸桿菌，該大腸桿菌菌株之例示包括有 BL21(DE3) 或 DH10B 等大腸桿菌菌株。

### 組成物

本發明亦相關於一種組成物，例如醫藥組成物，其包括有前述本發明所提供之蛋白質。

解決因富含脯胺酸之麩質所引起腹瀉，且本發明之具有脯胺酸寡胜肽酶活性之蛋白質所適用之範圍恰可彌補既有脯胺酸寡胜肽酶適用範圍之不足，因此本發明之組成物更具優秀之應用潛力。其中，該有效成分係指該蛋白質成為該組成物之成分，而能發揮該組成物所欲達成之功效或功能；且本發明之組成物可更進一步包括有一賦形劑，以讓該組成物被調配成例如固體、半固體或液體等適當形

態，使之更便於使用。

又，本發明亦相關於一種可配合具有脯胺酸殘基(residue)之前體藥物使用之組成物，其含有至少一醫藥上可接受之賦形劑與前述之蛋白質，並利用該蛋白質作為有效成分以發揮其脯胺酸寡胜肽酶活性，以處理該前體藥物而使其成為一有功效藥物。更佳的是，其進一步含有一與前述蛋白質結合之抗體。藉由將該抗體與前述蛋白質相結合，當該組成物被送入生物體之循環系統時，該蛋白質在生物體中可透過該抗體與特定組織之結合而定位。再接著將可配合使用之前體藥物送入生物體之循環系統，則由於僅在前述蛋白質定位處，該前體藥物方得以被該蛋白質所發揮之脯胺酸寡胜肽酶活性剪切為有效之藥物，因此可大幅增加該前體藥物之選擇性，而使作用之範圍更為精確，降低對其他組織產生影響。

#### 用途

本發明亦相關於一種使用前述本發明之蛋白質之應用，其係利用前述蛋白質作為有效成分，發揮其脯胺酸寡胜肽酶活性，從而處理異源性表現胜肽以供回收，以用於製造純化回收異源性表現胜肽之回收處理劑。

#### 生產方法

本發明亦相關於一種生產具有脯胺酸寡胜肽酶活性之蛋白質之方法，其係以提供前述轉形株；在可令具有脯胺酸寡胜肽酶活性之蛋白質被表現之環境下培養該轉形株；以及進行純化以獲取該蛋白質等步驟所組成。其中，該宿主細胞可採用但不限於前述 BL21(DE3) 或 DH10B 等大腸桿菌菌株形成之轉形株。

## 實施例

本發明之實際實施態樣及實施方法如下所示，但本發明所屬領域中常用、眾所周知或可得而知的各種已確立之技術手段，則酌減冗贅重覆之說明。又，各實施例係用以說明本發明而非限定本發明於該等實施例上。

### 實施例 1

#### 建立碎葉鬼傘 cDNA 庫 (cDNA library)

##### 並選殖脯胺酸寡胜肽酶之 cDNA

#### 1. 碎葉鬼傘脯胺酸寡胜肽酶基因片段之選殖及探針之製備

本發明先以人類的脯胺酸寡胜肽酶之胺基酸序列在 NCBI 網站上以 blast 分析真菌之基因體序列，找到較相關的灰蓋鬼傘岡山 7#130 菌株 (*Coprinopsis cinerea* okayama7#130) 與黃孢原毛平革菌 RP-78 菌株 (*Phanerochaete chrysosporium* RP-78) 之脯胺酸寡胜肽酶，並在本實施例中以灰蓋鬼傘岡山 7#130 菌株 ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genomeprj&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list\\_uids=9596](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genomeprj&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list_uids=9596)) 與黃孢原毛平革菌 RP-78 菌株 ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genomeprj&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list\\_uids=9525](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genomeprj&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list_uids=9525)) 二者之脯胺酸寡胜肽酶基因相似度高的區域設計引子 (primer)，獲取 Pro16 引子：

「5'-tacggcggmttcascacatctc-3' (SEQ ID NO:1)」及 Pro17 引子：「5'-tgccaytcytcwccraactc-3' (SEQ ID NO:2)」，再以碎葉鬼傘 DNA 作為模板 DNA (template DNA)，進行 PCR (polymerase chain reaction, 聚合酶連鎖反應)。

為進行 PCR 所調製之 PCR 混合液包括有：「最終濃度成份為 1 倍之 PCR 緩衝液、dNTP 0.2 mM、Pro16 引子及 Pro17 引子各 1  $\mu$ M、5 U pfu DNA 複製酶 (pfu DNA polymerase) (Roach) 以及適量的模板 DNA (即前述碎葉鬼傘或 cDNA)」並令該 PCR 混合液總體積為 50  $\mu$ l。

PCR 所使用儀器為 ABI 9700 (Applied Bioscience)，所使用條件為：

94  $^{\circ}$ C, 3 分鐘 [循環 1 次]；

94  $^{\circ}$ C, 30 秒, 64  $^{\circ}$ C, 30 秒, 72  $^{\circ}$ C, 1 分鐘 [循環 5 次]；

94  $^{\circ}$ C, 30 秒, 60  $^{\circ}$ C, 30 秒, 72  $^{\circ}$ C, 1 分鐘 [循環 5 次]；

94  $^{\circ}$ C, 30 秒, 56  $^{\circ}$ C, 30 秒, 72  $^{\circ}$ C, 1 分鐘 [循環 35 次]；

72  $^{\circ}$ C, 7 分鐘 [循環 1 次]。

藉由上述之 PCR，可自前述模板 DNA 上擴增出一長度為 128 bp (base pair, 鹽基) 之擴增片段，再利用生物學方法將該擴增片段選殖到 PCR<sup>®</sup>2.1-TOPO 載體 (購自 Invitrogen) 上，以獲取一質體 (plasmid)，並稱該質體為 p128，且利用可行之定序方法確認包含擴增片段的區域之序列。

接著利用 p128 之序列設計 Pro20 引子「5'-tacggcggattcagcatctc-3' (SEQ ID NO:3)」與 Pro21「5'-tgccactcctcaccaaactc-3' (SEQ ID NO:4)」引子，再以 PCR DIG 標定套組 (PCR DIG labeling kit, 購自 Roche) 製作探針。製作探針過程中之 PCR 條件為：

94 °C, 3 分鐘 [循環 1 次] ;

94 °C, 30 秒, 58 °C, 30 秒, 72 °C, 40 秒 [循環 35 次] ;

72 °C, 七分鐘 [循環 1 次] 。

依照該 PCR DIG 標定套組之操作方法並進行該 PCR, 可獲得一探針。

## 2. 培養菌株

將碎葉鬼傘在 YMA (購自 Difco, 編號 Difco 0712) 之平板 (添加瓊膠製成之凝態培養基) 上於 25°C 培養 18 天後, 接菌於培養液 N。該培養液 N 含有: 2% 葡萄糖 (glucose, 購自 Merck), 0.3% 黃豆粉 (soybean flour), 1% 胰化蛋白胨 (Tryptone), 0.3%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck), 0.1%  $\text{MgSO}_4$  (Merck), 且其 pH 值為 6。接著於 25°C、轉速 200 rpm 下培養七日。

## 3. 建立碎葉鬼傘互補 DNA 文庫

將碎葉鬼傘如上述培養至第七天, 取 1.2 g 除水菌絲體, 依據 TRIZOL 反應劑 (購自 Invitrogen) 之操作流程抽取全部 RNA (total RNA)。

首先係抽取碎葉鬼傘之全部 RNA, 在本實施例中取得約

325  $\mu\text{g}$ ，其  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  為 2.05；但全部 RNA 之抽取量並不嚴格限定，取得多達 500  $\mu\text{g}$  之全部 RNA 亦無不可。

再者，依據 PolyAtract<sup>®</sup> mRNA 單離系統套組 (PolyAtract<sup>®</sup> mRNA isolation systems kit, 購自 Promega) 之操作流程，對所取得之全部 RNA 進行 mRNA 的萃取，取得 6  $\mu\text{g}$  且  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  為 2.01 之 polyA mRNA (具有聚腺苷酸之 mRNA)。

接著，取 2-7  $\mu\text{g}$  polyA mRNA 依據 ZAP-cDNA<sup>®</sup> Gigapack<sup>®</sup> III Gold 選殖套組 (ZAP-cDNA<sup>®</sup> Gigapack<sup>®</sup> III Gold Cloning Kit, 購自 Stratagen) 之操作流程建立碎葉菌互補 DNA 文庫。在本實施例中，係接著藉由該 ZAP-cDNA<sup>®</sup> Gigapack<sup>®</sup> III Gold 選殖套組回收 0.75 - 3 kb DNA 片段，並篩選  $8 \times 10^5$  顆溶菌斑 (plaque) 以建立互補 DNA 文庫。

該碎葉菌互補 DNA 文庫之中的個別菌株分別帶有不同的質體，且各質體係由至少一載體與至少一 cDNA 所構成。其中該載體上具有複數之限制酶切位 (restriction site)，在本實施例中，該載體至少包括 *EcoRI* 與 *HindIII* 等限制酶 (restriction enzyme) 之切位，且其位於 cDNA 兩端處之序列係分別為對應於 T3 引子與 T7 引子之序列。

#### 4. 挑選溶菌斑

再依照 Gigapack<sup>®</sup> III Gold Cloning Kit (購自 Stratagen) 之後續操作流程進行溶菌斑雜合 (Plaque hybridization)，得到複數由輔助噬菌體 (helper phage) 所形成之溶菌斑，並製作一溶菌斑採測材料 (plaque

lift)，其中通常採用硝化纖維素膜(nitrocellulose membrane)作為該溶菌斑採測材料。

該溶菌斑採測材料係先於 FastHyb 溶液(購自 Biochain) 在 50°C 下反應 2 小時進行預雜合(prehybridization)，再製備一含有探針之 FastHyb 溶液，並將該溶菌斑採測材料移入含有探針之 FastHyb 溶液中於 50°C 下反應 16 小時。

接著進行沖洗過程：

(1)以適量 2 X SSC, 0.1 % SDS 溶液於室溫下沖洗該溶菌斑採測材料五分鐘；

(2)反覆前述步驟(1)一次；

(3)對該溶菌斑採測材料以 0.5 X SSC, 0.1 % SDS 溶液於 65 °C 下充分作用 15 分鐘；

(4)反覆前述步驟(3)一次。

經上述沖洗該溶菌斑採測材料後，再使用針對探針所附 DIG 之抗體進行抗體偵測，並以 X 光底片進行自動放射顯影，可得到不同的訊號，以區分出具有訊號之溶菌斑以及不具訊號之溶菌斑。

## 5. 取得轉形株

經由上述方法，在本實施例中確定出 93 個有意義的訊號。依據 ZAP-cDNA<sup>®</sup> Gigapack<sup>®</sup> III Gold Cloning Kit 操作流程，經過二次篩選得到純淨單一的溶菌斑，以 T3 引子與 T7 引子進行 PCR，挑選 PCR 產物分子量最大的 11 個溶菌斑，並進行生體內剪接作用(*in vivo excision*)。

所得之轉形株質體以 *EcoRI* 與 *HindIII* 限制酶(restriction enzyme)同時作用進行確認，並用膠體電泳(gel electrophoresis)分析，並挑選出四個長度較長的轉形株，49-1、71-1、76-3 與 91-1。



(25~52頁)

## 6. 進行定序

在此定序步驟中，先以前述質體之載體上現有引子進行定序得知 cDNA 兩端之序列後，再依據所得知的序列更進一步設計引子並定序，以逐步完成全長 cDNA 之定序。

## 7. 獲取碎葉鬼傘脯胺酸寡胜肽酶之 cDNA 並確認其性質及相關數據

藉由上述步驟，可定出碎葉鬼傘脯胺酸寡胜肽酶 cDNA 之核酸序列 (SEQ ID NO:5)，其全長 2,508 nt，在第 65 nt 開始有一個 2,217 nt 之 ORF，編碼 739 個胺基酸 (SEQ ID NO:6)，該 739 個胺基酸之分子量為 83.9 kD 並構成一具有碎葉鬼傘脯胺酸寡胜肽酶活性之蛋白質。該碎葉鬼傘脯胺酸寡胜肽酶 cDNA 之核酸序列 (SEQ ID NO:5) 係：

```

ccacagttct ctctgtagac gcgtttggcc atccataact cgtcctcagc gtttctcgac      60
agct atg gtg acc aaa acc tgg gtt cct gac acg tat ccg caa gcc cgg      109
cgc tgc gac cac gtt gat acg tac acg agc gcc aaa cat ggc gag gtc      157
aag gtc gcg gac cct tat agg tgg atg gag gag tat acg gac gag acg      205
gac aaa tgg acg tct gct cag gaa gcg tat aca cgc gcg tat atc gat      253
aaa tac cct cat cgg cag cgg ttg gaa gat gcg ttc atg gcc agt ctg      301
gac tat gcc agg gct ggt gca cca gtc aag agt gac aag aaa cgg tgg      349
tac tgg tcc tat aac agc gga ttg cag cct cag aac gtt tac tac cgg      397
tcg agg gac gga caa cta cct gat agg tcc aaa ggg ctc gac aat gga      445
gag gtc ttc atg gat atg aac ctc ctt tcg gag gac ggg aca gca gcc      493

```

atc agt gtc cac gcg ttc tct gac aat gga gag tac tac gcc tat ggt	541
gta tca tac tcc gga agc gac ttc acc acc gtc tac att cgg cgg aca	589
gac tct ccg cta gct tca aag gaa cag gcc gag aaa gac acc ggt cgt	637
cta ccg gac gtt ctc aac tac gtt aaa ttt tcc tct ctt cgc tgg acg	685
cct gac tcg aag ggc ttc ttc tac cag aga tac ccg gac cac aat gga	733
aac acc ggc tct gat aag cct agc gac tct gga att gag acc aga ggc	781
gat aag gac gcc atg ctt tat tat cat cgc gtt aac act cct caa tct	829
gag gat atc ctc gta tac tac gac aag acg aaa ccc gac tgg atg tac	877
ggc atc gat gtt act gac gat gac aag tac gtc gtc atg agc gtt gtt	925
cag gat act tcg agg aaa aat ctg ctt tgg ata gca gag ctc acg gac	973
gac ttc atc gag aag ggc ttc aaa tgg aac agg gtc atg gac aag ttt	1021
gac gct gaa tat gaa tat atc aag aat gag ggt cct gtc ttt gtc ctc	1069
cga acc aac gag aat gcg cca aaa tat aag gtg gtc acg gtg gac gtg	1117
tcc aag gac aat gaa gtc aaa ccg ttc atc cct gag agt gac ggg ttc	1165
ttg gag agc atc tac gcc gtc aac aag ggg aat aac ttt gtt gtc act	1213
tac aag cgg aat gtc aaa gat gag att tat gtc tac tcg aaa gag ggc	1261
aaa gaa ctc gaa cgg ctt gtt cct gat ttt atc ggt tca gct tca gta	1309
act gcg aga tgg gaa gat acc tgg ttc ttc atc aac tgc agc ggg ttc	1357
aca acg ccc ggc acg att ggg cga tac gac ttt aca gcg cct gaa ggg	1405
cag cgg tgg agt acc tac cac caa act cag gtg aat ggt ctg aac ccg	1453
gaa gag ttt gaa gca aga cag gac tgg tac gag agc aag gac ggg acc	1501
aag att cct atg ttc atc gtt cgt cac aag tcg acg cca ttt gat ggg	1549
act gct cca gca gtc caa tac ggt tat ggc ggt ttc agc atc tca atc	1597
aac ccc ttc ttt agc ccg acc atc ctc act ttc ttg aag aca tac gga	1645

gca gtc tac gct gtt gcc aat atc aga ggg gga ggc gag ttt gga gag 1693  
gag tgg cat gaa aat ggt atg agg gaa aag aag cac aat tgc ttt gac 1741  
gac ttc atc gct gga gcc gag tat ctt gta aag agc aag tat gct gct 1789  
cca gga aaa gtc acc atc aat ggc ggg tcg aat gga ggt ctc ctt gtt 1837  
tct gct tgc gtg aat cga gca ccc gaa ggc acg ttc ggt gct gca att 1885  
gcg gaa gtt ggt gta cat gat ttg ctt cga ttc cat aaa ttc aca atc 1933  
gga cga gcc tgg ata agc gac tac ggt gac ccg gac gat cct aaa gac 1981  
ttt gac ttc atc tat cct atc tcg cca ctg cag aat gtc tcg ccc aca 2029  
aag gtt cta ccg ccc tac atg ctc tca act gct gat cac gac gac cgt 2077  
gtc gta ccc agt cac tcg ttc aag atg gca gct act cta caa cat ctg 2125  
cga gcg aac aac cct agt cct att ctc ctg agg gtg gat aag aag gct 2173  
gga cat ggc gcc ggg aag tcg act aag aag agg gtc gaa gag tcg gcg 2221  
gat aag tgg agt ttt gtt gcg cag gct ttg ggc ttg gag tgg aaa gat 2269  
aaa gct aca ctc tag gtcctggtc tctgatgtct tgggattgcg gttgggtatc 2324  
tcattgaggc gatattcggg ctttggacat ggcttccgca tggacatctg ttatacacga 2384  
tttgctatcg ggttgtttat actgtagcta ctctactaat tggatgctca gcttgggtgca 2444  
ggcgttgctg gtgcaatgctc tgtttttaga aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2504  
aaaa 2508

」。又該碎葉鬼傘脯胺酸寡胜肽酶 cDNA 之核酸序列 (SEQ ID NO:5) 所編碼 739 個胺基酸 (SEQ ID NO:6) 係：

Met Val Thr Lys Thr Trp Val Pro Asp Thr Tyr Pro Gln Ala Arg Arg

1                    5                    10                    15

Cys Asp His Val Asp Thr Tyr Thr Ser Ala Lys His Gly Glu Val Lys

20                    25                    30

Val Ala Asp Pro Tyr Arg Trp Met Glu Glu Tyr Thr Asp Glu Thr Asp

35

40

45

Lys Trp Thr Ser Ala Gln Glu Ala Tyr Thr Arg Ala Tyr Ile Asp Lys

50

55

60

Tyr Pro His Arg Gln Arg Leu Glu Asp Ala Phe Met Ala Ser Leu Asp

65

70

75

80

Tyr Ala Arg Ala Gly Ala Pro Val Lys Ser Asp Lys Lys Arg Trp Tyr

85

90

95

Trp Ser Tyr Asn Ser Gly Leu Gln Pro Gln Asn Val Tyr Tyr Arg Ser

100

105

110

Arg Asp Gly Gln Leu Pro Asp Arg Ser Lys Gly Leu Asp Asn Gly Glu

115

120

125

Val Phe Met Asp Met Asn Leu Leu Ser Glu Asp Gly Thr Ala Ala Ile

130

135

140

Ser Val His Ala Phe Ser Asp Asn Gly Glu Tyr Tyr Ala Tyr Gly Val

145

150

155

160

Ser Tyr Ser Gly Ser Asp Phe Thr Thr Val Tyr Ile Arg Arg Thr Asp

165

170

175

Ser Pro Leu Ala Ser Lys Glu Gln Ala Glu Lys Asp Thr Gly Arg Leu

180

185

190

Pro Asp Val Leu Asn Tyr Val Lys Phe Ser Ser Leu Arg Trp Thr Pro

195

200

205

Asp Ser Lys Gly Phe Phe Tyr Gln Arg Tyr Pro Asp His Asn Gly Asn

210

215

220

Thr Gly Ser Asp Lys Pro Ser Asp Ser Gly Ile Glu Thr Arg Gly Asp			
225	230	235	240
Lys Asp Ala Met Leu Tyr Tyr His Arg Val Asn Thr Pro Gln Ser Glu			
	245	250	255
Asp Ile Leu Val Tyr Tyr Asp Lys Thr Lys Pro Asp Trp Met Tyr Gly			
	260	265	270
Ile Asp Val Thr Asp Asp Asp Lys Tyr Val Val Met Ser Val Val Gln			
	275	280	285
Asp Thr Ser Arg Lys Asn Leu Leu Trp Ile Ala Glu Leu Thr Asp Asp			
290	295	300	
Phe Ile Glu Lys Gly Phe Lys Trp Asn Arg Val Met Asp Lys Phe Asp			
305	310	315	320
Ala Glu Tyr Glu Tyr Ile Lys Asn Glu Gly Pro Val Phe Val Leu Arg			
	325	330	335
Thr Asn Glu Asn Ala Pro Lys Tyr Lys Val Val Thr Val Asp Val Ser			
	340	345	350
Lys Asp Asn Glu Val Lys Pro Phe Ile Pro Glu Ser Asp Gly Phe Leu			
355	360	365	
Glu Ser Ile Tyr Ala Val Asn Lys Gly Asn Asn Phe Val Val Thr Tyr			
370	375	380	
Lys Arg Asn Val Lys Asp Glu Ile Tyr Val Tyr Ser Lys Glu Gly Lys			
385	390	395	400
Glu Leu Glu Arg Leu Val Pro Asp Phe Ile Gly Ser Ala Ser Val Thr			
	405	410	415

Ala Arg Trp Glu Asp Thr Trp Phe Phe Ile Asn Cys Ser Gly Phe Thr

420

425

430

Thr Pro Gly Thr Ile Gly Arg Tyr Asp Phe Thr Ala Pro Glu Gly Gln

435

440

445

Arg Trp Ser Thr Tyr His Gln Thr Gln Val Asn Gly Leu Asn Pro Glu

450

455

460

Glu Phe Glu Ala Arg Gln Asp Trp Tyr Glu Ser Lys Asp Gly Thr Lys

465

470

475

480

Ile Pro Met Phe Ile Val Arg His Lys Ser Thr Pro Phe Asp Gly Thr

485

490

495

Ala Pro Ala Val Gln Tyr Gly Tyr Gly Gly Phe Ser Ile Ser Ile Asn

500

505

510

Pro Phe Phe Ser Pro Thr Ile Leu Thr Phe Leu Lys Thr Tyr Gly Ala

515

520

525

Val Tyr Ala Val Ala Asn Ile Arg Gly Gly Gly Glu Phe Gly Glu Glu

530

535

540

Trp His Glu Asn Gly Met Arg Glu Lys Lys His Asn Cys Phe Asp Asp

545

550

555

560

Phe Ile Ala Gly Ala Glu Tyr Leu Val Lys Ser Lys Tyr Ala Ala Pro

565

570

575

Gly Lys Val Thr Ile Asn Gly Gly Ser Asn Gly Gly Leu Leu Val Ser

580

585

590

Ala Cys Val Asn Arg Ala Pro Glu Gly Thr Phe Gly Ala Ala Ile Ala

595

600

605

Glu Val Gly Val His Asp Leu Leu Arg Phe His Lys Phe Thr Ile Gly

610

615

620

Arg Ala Trp Ile Ser Asp Tyr Gly Asp Pro Asp Asp Pro Lys Asp Phe

625

630

635

640

Asp Phe Ile Tyr Pro Ile Ser Pro Leu Gln Asn Val Ser Pro Thr Lys

645

650

655

Val Leu Pro Pro Tyr Met Leu Ser Thr Ala Asp His Asp Asp Arg Val

660

665

670

Val Pro Ser His Ser Phe Lys Met Ala Ala Thr Leu Gln His Leu Arg

675

680

685

Ala Asn Asn Pro Ser Pro Ile Leu Leu Arg Val Asp Lys Lys Ala Gly

690

695

700

His Gly Ala Gly Lys Ser Thr Lys Lys Arg Val Glu Glu Ser Ala Asp

705

710

715

720

Lys Trp Ser Phe Val Ala Gln Ala Leu Gly Leu Glu Trp Lys Asp Lys

725

730

735

Ala Thr Leu」。

又如表一所示，將碎葉鬼傘脯胺酸寡胜肽酶胺基酸序列以套裝軟體 GCG(Accelrys)之 GAP 程式與其他物種脯胺酸寡胜肽酶胺基酸序列比較，結果以非洲爪蟾 (*Xenopus tropicalis*) 相同性最高 (45.8 %)，其次為玉米黑穗菌 (*Ustilago maydis*) (44.7 %)，與人、鼠、豬、藍綠藻、阿拉伯芥及牛間之相同性 (40~43.9%) 反較同屬擔子菌屬之新型隱球菌 (*Cryptococcus neoformans*) 相同性 (31.6~32 %)

高。

表一、碎葉鬼傘脯胺酸寡胜肽酶胺基酸序列與其他物種相似性比較結果

來源(物種名)	相似度 (Similarity)(%)	相同性 (Identity) (%)
非洲爪蟾( <i>Xenopus tropicalis</i> )	54.6	45.8
黑穗菌( <i>Ustilago maydis</i> )	54.2	44.6
雜色念珠藻( <i>Anabaena variabilis</i> )	55.1	43.9
人(Human)	54.6	43.8
人(Human-2)	54.5	43.7
鼠(mouse)	53.7	43.5
大鼠(rat)	53.5	43.5
豬(pig)	54.0	43.2
念珠藻屬( <i>Nostoc</i> sp.)	54.9	43.2
亞洲稻( <i>Oryza sativa</i> )	53.2	43.2
阿拉伯芥( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	52.6	43.2
牛(bovine)	53.2	43.0
耐輻射球菌( <i>Deinococcus radiodurans</i> )	49.6	39.9
斑點氣單胞菌( <i>Aeromonas punctata</i> )	50.8	39.2
嗜水氣單胞菌( <i>Aeromonas hydrophila</i> )	49.9	38.6
莢膜新鞘脂菌( <i>Novosphingobium capsulatum</i> )	47.2	37.7
腦膜炎敗血黃桿菌 ( <i>Flavobacterium meningosepticum</i> )	47.4	37.6
極端嗜熱古菌( <i>Pyrococcus horikoshii</i> )	45.2	34.9
極端嗜熱阿比西古菌( <i>Pyrococcus abyssi</i> )	46.6	34.6
極端嗜熱厭氧古菌( <i>Pyrococcus furiosus</i> )	44.9	33.2



新型隱球菌-( <i>Cryptococcus neoformans</i> )	44.5	32.0
新型隱球菌 ( <i>Cryptococcus neoformans</i> -2)	42.2	31.6
嗜蟲假單胞菌 ( <i>Pseudomonas entomophila</i> )	36.0	28.5
腦膜炎球菌( <i>Neisseria meningitidis</i> )	34.9	27.1

由上述可知，在不同物種之中具有與 SEQ ID NO:5 所編碼之胺基酸序列 SEQ ID NO:6 之相似度在 60% 以下之各種胺基酸序列，其中由於胺基酸序列之變異並不必然影響其所構成蛋白質之活性，因此只要胺基酸序列之變異不影響該蛋白質之活性，仍屬於本發明之範圍。

上述相似度較佳是 70% 以上。

上述相似度更佳是 80% 以上。

上述相似度更較佳是 90% 以上。

上述相似度最佳是 95% 以上。

## 實施例 2

### 碎葉鬼傘脯胺酸寡胜肽酶 cDNA 在大腸桿菌之表現

以 Pro 31 引子「5'-atggtgaccaaaccctgggt-3'(SEQ ID NO:7)」與 Pro 32 引子「5'-ctagagtgtagctttatctttc-3'(SEQ ID NO:8)」，使用 pfu 複製酶進行 PCR 增生一含有終止密碼子(stop codon)之完整脯胺酸寡胜肽酶 cDNA。

該 PCR 所使用條件為：

94 °C, 3 分鐘[循環 1 次]；

94 °C, 30 秒, 58 °C, 30 秒, 72 °C, 180 秒 [循環 35 次];  
72 °C, 3 分鐘 [循環 1 次]。

將上述 PCR 所得到的完整脯胺酸寡胜肽酶 cDNA, 以及一含有對應 T7 引子序列及 N 端 His-tag(組胺酸標幟)的 pET 151/D-TOPO 表現載體 (Invitrogen) 進行接合反應, 以構成一基因重組質體, 並將該基因重組質體送入 DH10B 大腸桿菌菌株 (購自 Invitrogen) 中並於 37 °C 以 LB 培養液 (購自 USB) 或 LB 平板 (購自 USB) 培養之, 以獲取複數菌落 (colony)。從該複數菌落中挑選其中三菌落, 並依生物學方法自各菌落之大腸桿菌中取得基因重組質體, 再將該等基因重組質體送入 BL21(DE3) 大腸桿菌菌株 (購自 Invitrogen) 中進行表現。

上述三組合基因重組質體之 BL21(DE3) 大腸桿菌菌株以 LB 培養液於搖瓶中培養至 OD<sub>600</sub> 大約 0.4-0.6 時, 加入終濃度為 0.4 mM 的 IPTG 繼續培養 20 小時, 使各含有基因重組質體之 BL21(DE3) 大腸桿菌菌株表現其基因重組質體之碎葉鬼傘脯胺酸寡胜肽酶 cDNA, 其所表現之具有脯胺酸寡胜肽酶活性的蛋白質係參考 pET 系統 (pET system, 購自 Novagen) 使用手冊所揭露之蛋白質純化方法進行純化, 以 Bio-Rad 蛋白質試驗 (Bio-Rad Protein Assay) (購自 Bio-Rad) 測定蛋白質量, 並使用牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 做為標準, 以其作出標準曲線 (standard curve) 後據以測定蛋白質量。

此外, 亦可配合實際上應用或研究等需求, 以上述之

技術手段，將上述脯胺酸寡胜肽酶 cDNA 置於一可驅動表現該脯胺酸寡胜肽酶 cDNA 之驅動子或控制序列的控制之下，使該脯胺酸寡胜肽酶 cDNA 可操作地連結到該驅動子或該控制序列以構築成一嵌合基因或一核酸構築體，並藉由該驅動子或該控制序列驅動表現之能力，令該嵌合基因或該核酸構築體於一細胞中被驅動表現。

### 實施例 3

#### 測定碎葉鬼傘脯胺酸寡胜肽酶活性

#### 1. 挑選 pProHN14 及 pProHN17 並測定其所編碼蛋白質脯胺酸寡胜肽酶之活性

取適當稀釋之脯胺酸寡胜肽酶溶液先與 1 N HCl 終止液反應，再加入其他試劑以作為控制組並建立 OD<sub>410</sub> 對於重氮化對硝基苯胺(p-nitroaniline, 購自 Fluka)產生量的標準曲線，以作為測定之根據，並定義前述在 pH 為 7.0，反應溫度為 45 °C 之條件下，每分鐘產生 1 微莫耳(μmole) 重氮化對硝基苯胺之脯胺酸寡胜肽酶活性為 1 U。

於微量離心管中加入 400 μl 之 0.1 M 鈉-磷酸緩衝液(Na-phosphate buffer)、50μl 之 10mM Z-甘胺醯基-L-脯胺酸-4-硝基苯胺(Z-glycyl-L-proline-4-nitroanilide, 購自 Fluka)及 50 μl 之經適當稀釋具有脯胺酸寡胜肽酶活性蛋白質之溶液，反應 5-60 分鐘，加入 500 μl 之 1 N HCl 終止反應之後，以 13,000 rpm 離心 5 分鐘，取上清液測 OD<sub>410</sub>。

取前述上清液所測得之  $OD_{410}$ ，對應上述標準曲線，分別求得前述三組 BL21(DE3) 大腸桿菌菌株所表現脯胺酸寡胜肽酶之活性，並從中選出表現活性較高之二組，其分別由基因重組質體 pProHN14 及 pProHN17 所編碼，而 pProHN14 及 pProHN17 之蛋白質在 BL21(DE3)大腸桿菌菌株中於胞內所表現之脯胺酸寡胜肽酶活性分別為 7.2 U/ml 與 7.7 U/ml。

## 2. 對 pProHN14 及 pProHN17 之完整脯胺酸寡胜肽酶 cDNA 進行定序

將 pProHN14 及 pProHN17 以可行之定序方法進行定序。依定序結果可知 pProHN17 之完整脯胺酸寡胜肽酶 cDNA 之核酸序列符合原先設計，具有 SEQ ID NO:5 所記載之核酸序列。

另一方面，pProHN14 則具有 SEQ ID NO:9 所示之核酸序列。相較於 pProHN17，pProHN14 由於在 C 端缺少 4 個核酸(CTAG)而造成讀框轉移(frame-shift)，使得 pProHN14 所表現之具有脯胺酸寡胜肽酶活性之蛋白質的胺基酸序列 (SEQ ID NO:10)在 C 端比預期多出 24 個胺基酸，其係：「R ASSDPAANKA RKEAELAAAT AEQ」。該 24 個胺基酸亦可記載為：「Arg Ala Ser Ser Asp Pro Ala Ala Asn Lys Ala Arg Lys Glu Ala Glu Leu Ala Ala Ala Thr Ala Glu Gln」。其中，前述 pProHN14 所具有 SEQ ID NO:9 之核酸序列係：「atg gtg acc aaa acc tgg gtt cct gac acg tat ccg caa gcc cgg cgc 48

tgc gac cac gtt gat acg tac acg agc gcc aaa cat ggc gag gtc aag	96
gtc gcg gac cct tat agg tgg atg gag gag tat acg gac gag acg gac	144
aaa tgg acg tct gct cag gaa gcg tat aca cgc gcg tat atc gat aaa	192
tac cct cat cgg cag cgg ttg gaa gat gcg ttc atg gcc agt ctg gac	240
tat gcc agg gct ggt gca cca gtc aag agt gac aag aaa cgg tgg tac	288
tgg tcc tat aac agc gga ttg cag cct cag aac gtt tac tac cgg tcg	336
agg gac gga caa cta cct gat agg tcc aaa ggg ctc gac aat gga gag	384
gtc ttc atg gat atg aac ctc ctt tcg gag gac ggg aca gca gcc atc	432
agt gtc cac gcg ttc tct gac aat gga gag tac tac gcc tat ggt gta	480
tca tac tcc gga agc gac ttc acc acc gtc tam att cgg cgg aca gac	528
tct ccg cta gct tca aag gaa cag gcc gag aaa gac acc ggt cgt cta	576
ccg gac gtt ctc aac tac gtt aaa ttt tcc tct ctt cgc tgg acg cct	624
gac tcg aag ggc ttc ttc tac cag aga tac ccg gac cac aat gga aac	672
acc ggc tct gat aag cct agc gac tct gga att gag acc aga ggc gat	720
aag gac gcc atg ctt tat tat cat cgc gtt aac act cct caa tct gag	768
gat atc ctc gta tac tac gac aag acg aaa ccc gac tgg atg tac ggc	816
atc gat gtt act gac gat gac aag tac gtc gtc atg agc gtt gtt cag	864
gat act tcg agg aaa aat ctg ctt tgg ata gca gag ctc acg gac gac	912
ttc atc gag aag ggc ttc aaa tgg aac agg gtc atg gac aag ttt gac	960
gct gaa tat gaa tat atc aag aat gag ggt cct gtc ttt gtc ctc cga	1008
acc aac gag aat gcg cca aaa tat aag gtg gtc acg gtg gac gtg tcc	1056
aag gac aat gaa gtc aaa ccg ttc atc cct gag agt gac ggg ttc ttg	1104
gag agc atc tac gcc gtc aac aag ggg aat aac ttt gtt gtc act tac	1152
aag cgg aat gtc aaa gat gag att tat gtc tac tcg aaa gag ggc aaa	1200

gaa ctc gaa cgg ctt gtt cct gat ttt atc ggt tca gct tca gta act	1248
gcg aga tgg gaa gat acc tgg ttc ttc atc aac tgc agc ggg ttc aca	1296
acg ccc ggc acg att ggg cga tac gac ttt aca gcg cct gaa ggg cag	1344
cgg tgg agt acc tac cac caa act cag gtg aat ggt ctg aac ccg gaa	1392
gag ttt gaa gca aga cag gac tgg tac gag agc aag gac ggg acc aag	1440
att cct atg ttc atc gtt cgt cac aag tcg acg cca ttt gat ggg act	1488
gct cca gca gtc caa tac ggt tat ggc ggt ttc agc atc tca atc aac	1536
ccc ttc ttt agc ccg acc atc ctc act ttc ttg aag aca tac gga gca	1584
gtc tac gct gtt gcc aat atc aga ggg gga ggc gag ttt gga gag gag	1632
tgg cat gaa aat ggt atg agg gaa aag aag cac aat tgc ttt gac gac	1680
ttc atc gct gga gcc gag tat ctt gta aag agc aag tat gct gct cca	1728
gga aaa gtc acc atc aat ggc ggg tcg aat gga ggt ctc ctt gtt tct	1776
gct tgc gtg aat cga gca ccc gaa ggc acg ttc ggt gct gca att gcg	1824
gaa gtt ggt gta cat gat ttg ctt cga ttc cat aaa ttc aca atc gga	1872
cga gcc tgg ata agc gac tac ggt gac ccg gac gat cct aaa gac ttt	1920
gac ttc atc tat cct atc tcg cca ctg cag aat gtc tcg ccc aca aag	1968
gtt cta ccg ccc tac atg ctc tca act gct gat cac gac gac cgt gtc	2016
gta ccc agt cac tcg ttc aag atg gca gct act cta caa cat ctg cga	2064
gcg aac aac cct agt cct att ctc ctg agg gtg gat aag aag gct gga	2112
cat ggc gcc ggg aag tcg act aag aag agg gtc gaa gag tcg gcg gat	2160
aag tgg agt ttt gtt gcg cag gct ttg ggc ttg gag tgg aaa gat aaa	2208
gct aca cta agg gcg agc tca gat ccg gct gct aac aaa gcc cga aag	2256
gaa gct gag ttg gct gct gcc acc gct gag caa	2289

」。前述 pProHN14 所表現之具有脯胺酸寡胜肽酶活性之蛋

白質的胺基酸序列 (SEQ ID NO:10)係：「

Met Val Thr Lys Thr Trp Val Pro Asp Thr Tyr Pro Gln Ala Arg Arg

1                    5                    10                    15

Cys Asp His Val Asp Thr Tyr Thr Ser Ala Lys His Gly Glu Val Lys

20                    25                    30

Val Ala Asp Pro Tyr Arg Trp Met Glu Glu Tyr Thr Asp Glu Thr Asp

35                    40                    45

Lys Trp Thr Ser Ala Gln Glu Ala Tyr Thr Arg Ala Tyr Ile Asp Lys

50                    55                    60

Tyr Pro His Arg Gln Arg Leu Glu Asp Ala Phe Met Ala Ser Leu Asp

65                    70                    75                    80

Tyr Ala Arg Ala Gly Ala Pro Val Lys Ser Asp Lys Lys Arg Trp Tyr

85                    90                    95

Trp Ser Tyr Asn Ser Gly Leu Gln Pro Gln Asn Val Tyr Tyr Arg Ser

100                    105                    110

Arg Asp Gly Gln Leu Pro Asp Arg Ser Lys Gly Leu Asp Asn Gly Glu

115                    120                    125

Val Phe Met Asp Met Asn Leu Leu Ser Glu Asp Gly Thr Ala Ala Ile

130                    135                    140

Ser Val His Ala Phe Ser Asp Asn Gly Glu Tyr Tyr Ala Tyr Gly Val

145                    150                    155                    160

Ser Tyr Ser Gly Ser Asp Phe Thr Thr Val Xaa Ile Arg Arg Thr Asp

165                    170                    175

Ser Pro Leu Ala Ser Lys Glu Gln Ala Glu Lys Asp Thr Gly Arg Leu

	180		185		190
Pro Asp Val	Leu Asn Tyr	Val Lys Phe	Ser Ser Leu	Arg Trp Thr	Pro
	195		200		205
Asp Ser Lys	Gly Phe Phe	Tyr Gln Arg	Tyr Pro Asp	His Asn Gly	Asn
	210		215		220
Thr Gly Ser	Asp Lys Pro	Ser Asp Ser	Gly Ile Glu	Thr Arg Gly	Asp
	225		230		235
Lys Asp <u>Ala</u>	Met Leu Tyr	Tyr His Arg	Val Asn Thr	Pro Gln Ser	Glu
		245		250	
Asp Ile Leu	Val Tyr Tyr	Asp Lys Thr	Lys Pro Asp	Trp Met Tyr	Gly
	260		265		270
Ile Asp Val	Thr Asp Asp	Asp Lys Tyr	Val Val Met	Ser Val Val	Gln
	275		280		285
Asp Thr Ser	Arg Lys Asn	Leu Leu Trp	Ile Ala Glu	Leu Thr Asp	Asp
	290		295		300
Phe Ile Glu	Lys Gly Phe	Lys Trp Asn	Arg Val Met	Asp Lys Phe	Asp
	305		310		315
Ala Glu Tyr	Glu Tyr Ile	Lys Asn Glu	Gly Pro Val	Phe Val Leu	Arg
		325		330	
Thr Asn Glu	Asn Ala Pro	Lys Tyr Lys	Val Val Thr	Val Asp Val	Ser
	340		345		350
Lys Asp Asn	Glu Val Lys	Pro Phe Ile	Pro Glu Ser	Asp Gly Phe	Leu
	355		360		365
Glu Ser Ile	Tyr Ala Val	Asn Lys Gly	Asn Asn Phe	Val Val Thr	Tyr



370	375	380	
Lys Arg Asn Val	Lys Asp Glu Ile Tyr Val Tyr Ser	Lys Glu Gly Lys	
385	390	395	400
Glu Leu Glu Arg Leu Val Pro Asp Phe Ile Gly Ser Ala Ser Val Thr			
	405	410	415
Ala Arg Trp Glu Asp Thr Trp Phe Phe Ile Asn Cys Ser Gly Phe Thr			
	420	425	430
Thr Pro Gly Thr Ile Gly Arg Tyr Asp Phe Thr Ala Pro Glu Gly Gln			
	435	440	445
Arg Trp Ser Thr Tyr His Gln Thr Gln Val Asn Gly Leu Asn Pro Glu			
	450	455	460
Glu Phe Glu Ala Arg Gln Asp Trp Tyr Glu Ser Lys Asp Gly Thr Lys			
	465	470	475
Ile Pro Met Phe Ile Val Arg His Lys Ser Thr Pro Phe Asp Gly Thr			
	485	490	495
Ala Pro Ala Val Gln Tyr Gly Tyr Gly Gly Phe Ser Ile Ser Ile Asn			
	500	505	510
Pro Phe Phe Ser Pro Thr Ile Leu Thr Phe Leu Lys Thr Tyr Gly Ala			
	515	520	525
Val Tyr Ala Val Ala Asn Ile Arg Gly Gly Gly Glu Phe Gly Glu Glu			
	530	535	540
Trp His Glu Asn Gly Met Arg Glu Lys Lys His Asn Cys Phe Asp Asp			
	545	550	555
Phe Ile Ala Gly Ala Glu Tyr Leu Val Lys Ser Lys Tyr Ala Ala Pro			

	565		570		575										
Gly	Lys	Val	Thr	Ile	Asn	Gly	Gly	Ser	Asn	Gly	Gly	Leu	Leu	Val	Ser
	580		585		590										
Ala	Cys	Val	Asn	Arg	Ala	Pro	Glu	Gly	Thr	Phe	Gly	Ala	Ala	Ile	Ala
	595		600		605										
Glu	Val	Gly	Val	His	Asp	Leu	Leu	Arg	Phe	His	Lys	Phe	Thr	Ile	Gly
	610		615		620										
Arg	Ala	Trp	Ile	Ser	Asp	Tyr	Gly	Asp	Pro	Asp	Asp	Pro	Lys	Asp	Phe
	625		630		635										
Asp	Phe	Ile	Tyr	Pro	Ile	Ser	Pro	Leu	Gln	Asn	Val	Ser	Pro	Thr	Lys
	645		650		655										
Val	Leu	Pro	Pro	Tyr	Met	Leu	Ser	Thr	Ala	Asp	His	Asp	Asp	Arg	Val
	660		665		670										
Val	Pro	Ser	His	Ser	Phe	Lys	Met	Ala	Ala	Thr	Leu	Gln	His	Leu	Arg
	675		680		685										
Ala	Asn	Asn	Pro	Ser	Pro	Ile	Leu	Leu	Arg	Val	Asp	Lys	Lys	Ala	Gly
	690		695		700										
His	Gly	Ala	Gly	Lys	Ser	Thr	Lys	Lys	Arg	Val	Glu	Glu	Ser	Ala	Asp
	705		710		715										
Lys	Trp	Ser	Phe	Val	Ala	Gln	Ala	Leu	Gly	Leu	Glu	Trp	Lys	Asp	Lys
	725		730		735										
Ala	Thr	Leu	Arg	Ala	Ser	Ser	Asp	Pro	Ala	Ala	Asn	Lys	Ala	Arg	Lys
	740		745		750										
Glu	Ala	Glu	Leu	Ala	Ala	Ala	Thr	Ala	Glu	Gln					

755

760

」。以 BCRC 36074 為模

版，於引子設計時特意使相對應之引子缺漏上述 pProHN14 在 C 端所缺少之 4 個核酸(CTAG)，即可利用 PCR 方式得到一序列，其 C 端較完整寡胜肽酶之 DNA 序列缺少 4 個核酸；進一步將該序列接入一表現載體，可獲取 SEQ ID NO: 6 之核酸序列和 SEQ ID NO: 10 之胺基酸序列。在一可行之實施態樣中，可採用 pET151/D-TOPO 作為該表現載體。

### 3. 比較 pProHN14 與 pProHN17 所表現之之蛋白質以及既有脯胺酸寡胜肽酶之活性與比活性

如上所述，pProHN14 及 pProHN17 之蛋白質在 BL21(DE3)大腸桿菌菌株中於胞內所表現之脯胺酸寡胜肽酶活性分別為 7.2 U/ml 與 7.7 U/ml，該活性近於腦膜炎敗血黃桿菌脯胺酸寡胜肽酶在大腸桿菌表現之活性(8.1 U/ml)，而優於其他大部分既有脯胺酸寡胜肽酶所表現之活性。

經由 Ni-NTA 管柱(管柱是自行裝填(packaging)，其樹脂(resin)為購自 Invitrogen 之 Ni-NTA 瓊膠)親和性步驟可得 pProHN14 與 pProHN17 之蛋白質經純化後，可測得純化蛋白質之脯胺酸寡胜肽酶比活性分別為 56.1 U/mg 與 66.8 U/mg，低於純化後之腦膜炎敗血黃桿菌脯胺酸寡胜肽酶比活性(124 U/mg)，而優於其他大部分既有脯胺酸寡胜肽酶在純化後所表現之比活性。

## 實施例 4

pProHN14 與 pProHN17 之  
脯胺酸寡胜肽酶基本性質分析

## 1. 最適合碎葉鬼傘脯胺酸寡胜肽酶反應之 pH 值

最適反應 pH 之測定方法係以 pH3-8 之檸檬酸-亞磷酸氫鈉緩衝溶液 (citric acid- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  buffer solution) 或 pH9-12 之甘胺酸-氫氧化鈉緩衝溶液 (glycine-NaOH buffer solution) 取代標準酶活性測定所用之緩衝液，其餘反應條件同上述脯胺酸寡胜肽酶活性之測定方法。

pProHN14 與 pProHN17 之蛋白質皆於 pH 7.0 反應時表現出最高脯胺酸寡胜肽酶活性。又 pProHN14 之蛋白質酶可較 pProHN17 之蛋白質適應更廣的 pH 範圍。其比較的結果如第一圖所示，在 pH 6.0 時，pProHN14 之蛋白質約有 90% 活性而 pProHN17 之蛋白質僅約有 50% 活性。

## 2. 最適合碎葉鬼傘脯胺酸寡胜肽酶之反應溫度

最適反應溫度之測定方法係令酶反應分別於 25、30、37、45 或 55°C 之溫度下進行，其餘反應條件同上述脯胺酸寡胜肽酶活性之測定方法。

其在 pH 7.0 時測定的結果如第二圖所示，pH 7.0 時 pProHN14 之蛋白質與 pProHN17 之蛋白質皆在 45°C 反應時表現出最高酶活性，可知其最適溫度為 45°C，而此最適溫度比現有比活性高的脯胺酸寡胜肽酶的最適溫度都高。

又在 pH 8.0 時測定的結果如第三圖所示，在 pH 8.0 時，pProHN14 之蛋白質與 pProHN17 之蛋白質皆以 37°C 反應的酶活性最高。

### 3. 碎葉鬼傘脯胺酸寡胜肽酶之熱安定性

酶之熱安定性之測定方法係將樣品於分別於 30°C、37°C 或 45°C 先預熱 0、20、40、60 或 80 分鐘，或於 55°C 下先預熱 0、5、10、15、20、25 或 30 分鐘，再以上述脯胺酸寡胜肽酶活性之測定方法進行酶活性測定。

其測定結果如第四圖所示，pProHN14 之蛋白質於 30°C 與 37°C 分別預熱 80 分鐘後，尚保有 99% 與 93% 之活性；而 pProHN17 之蛋白質於同樣條件下預熱後，則保有 80% 與 73% 之活性。

在 45°C 預熱 60 分鐘後，pProHN14 之蛋白質保有 67% 活性，而 pProHN17 之蛋白質僅保有 32% 活性，可知 pProHN14 之蛋白質之熱安定性高於 pProHN17 之蛋白質之熱安定性。

pProHN14 之蛋白質與 pProHN17 之蛋白質在 55°C 預熱 5 分鐘均僅殘存 9% 活性。

#### 【圖式簡單說明】

第一圖：係揭露不同 pH 值對 pProHN14 與 pProHN17 之蛋白質之脯胺酸寡胜肽酶活性影響之折線圖。其中「●」符號之折線表示 pProHN14 之蛋白質；「▲」符號之折線表

示 pProHN17 之蛋白質。

第二圖：係揭露 pH7.0 時溫度對 pProHN14 與 pProHN17 之蛋白質活性影響之柱狀圖。其中實心黑色柱表示 pProHN14 之蛋白質；空心白色柱表示 pProHN17 之蛋白質。

第三圖：係揭露 pH8.0 時溫度對 pProHN14 與 pProHN17 之蛋白質之脯胺酸寡胜肽酶活性影響之柱狀圖。其中實心黑色柱表示 pProHN14 之蛋白質；空心白色柱表示 pProHN17 之蛋白質。

第四圖：係揭露重組脯胺酸寡胜肽酶熱安定性之折線圖。其中「實線」之折線表示 pProHN14 之蛋白質；「虛線」之折線表示 pProHN17 之蛋白質。又，「●」符號之折線表示以 30°C 預熱；「■」符號之折線表示以 37°C 預熱；「▲」符號之折線表示以 45°C 預熱；「◆」符號之折線表示以 55°C 預熱。

#### 【主要元件符號說明】

無

#### 【參考資料】

1. Abdus Sattar, A. K. M., Yamamoto, N., Yoshimoto, T., and Tsuru, D. 1990. Purification and characterization of an extracellular prolyl endopeptidase from *Agaricus bisporus*. J.

Biochem. 107: 256-261.

2. Atack, J.R., Suman-Chauhan, N., Dawson, G., and Kulagowski, J. J. 1991. *In vitro* and *in vivo* inhibition of prolyl endopeptidase. Eur. J. Pharmacol. 205: 157-163.

3. Atta-ur-Rahman, Akhtar, M.N., Choudhary, M.I., Tsuda, Y., Yasin, A., Sener, B., Parvez, M. 2005. New diterpene isopimara-7,15-dien-19-oic acid and its prolyl endopeptidase inhibitory activity. Nat. Prod. Res. 19:13-22.

4. Diefenthal, T., Dargatz, H., Witte, V., Reipen, G., and Svendsen, I. 1993. Cloning of proline-specific endopeptidase gene from *Flavobacterium meningosepticum*: expression in *Escherichia coli* and purification of the heterologous protein. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40: 90-97.

5. Gass, J., Ehren, J., Strohmeler, G., Isaacs, I., Khosla, C. 2005. Fermentation, purification, formulation, and pharmacological evaluation of a prolyl endopeptidase from *Myxococcus xanthus*: implications for Celiac Sprue therapy. Biotechnol. Bioeng. 92(6):674-84.

6. Habibi-Najafi, M. B. and Lee, B.

H. 1994. Proline-specific peptidases of *Lactobacillus casei* subspecies. J. Dairy Sci. 77:385-392.

7. Harwood, V. J. Denson, J. D., Robinson-Bidle, K. A. and Schreier, H. J. 1997. Overexpression and characterization of a prolyl endopeptidase from the hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*. J. Bacteriol. 179: 3613-3618.

8. Harwood, V.J. and Schreier, H.J. 2001. Prolyl oligopeptidase from *Pyrococcus furiosus*. Methods Enzymol. 330: 445-454.

9. Heinis, C., Alessi, P., and Neri, D. 2004. Engineering a thermostable human prolyl endopeptidase for antibody-directed enzyme prodrug therapy. Biochemistry 43:6293-6303.

10. Jarho, E.M., Wallen, E.A., Christiaans, J.A., Forsberg, M.M., Venalainen, J.I., Mannisto, P.T., Gynther, J., and Poso, A. 2005. Dicarboxylic acid azacycle-1-prolyl-pyrrolidine amides as prolyl oligopeptidase inhibitors and three-dimensional quantitative structure-activity relationship of the enzyme-inhibitor interactions. J. Med. Chem. 48: 47772-4782.

11. Kanatani, A., Yoshimoto, T.,



Kitazono, A., Kokubo, T., and Tsuru, D. 1993. Prolyl endopeptidase from *Aeromonas hydrophila*: cloning, sequencing, and expression of the enzyme gene, and characterization of the expressed enzyme. *J. Biochem.* 113: 790-796.

12. Lee, J.H., Lee, S.Y., Lee, K.S., Jang, H.J., Lee, K.H., Hahn, T.R., and Paik, Y.S. 2004. Prolyl endopeptidase inhibitors from the leaves of *Ginkgo biloba*. *Planta Med.* 70:1228-1230.

13. Li, M., Chen, C., Wang, D. [Gene cloning and expression of prolyl endopeptidase from *Aeromonas punctata*] *Wei Sheng Wu Xue Bao.* 2000 40(3):277-283. Chinese.

14. Marighetto, A., Touzani, K., Etchamendy, N., Torrea, C.C., De Nanteuil, G., Guez, D., Jaffard, R., and Morain, P. 2000. Further evidence for a dissociation between different forms of mnemonic expressions in a mouse model of age-related cognitive decline: effects of tacrine and S 17092, a novel prolyl endopeptidase inhibitor. *Learn Mem.* 7: 159-169.

15. Marti, T., Molberg, O., Li, Q., Gray, G. M., Khosla, C., and Solid, L. M. 2005. Prolyl endopeptidase-mediated destruction of T cell

epitopes in whole gluten: chemical and immunological characterization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 312:19-26.

16. Matysiak-Budnk, T., Candalh, C., Cellier, C., Dugave, C., Namane, A., Vidal-Martinez, T., Cerf-Bensussan, N., and Heyman, M. 2005. Limited efficiency of prolyl-endopeptidase in the detoxification of gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterol.* 129(3):786-796.

17. Piper, J. L., Gray, G. M., and Khosla, C. 2004. Effect of prolyl endopeptidase on digestive-resistant gliadin peptides in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311: 213-219.

18. Polgár, L. 1994. Prolyl oligopeptidase. *Methods Enzymol.* 244: 188-200.

19. Polgár, L. 2002. The prolyl oligopeptidase family. *Cell. Mol. Life Sci.* 59: 349-362.

20. Pyle, G.G., Paaso, B., Anderson; B.E., Allen, D.D., Marti,T., Li, Q., Sieqel,M., Khosla, C., Gray, G.M. 2005. Effect of pretreatment of food gluten with prolyl endopeptidase on gluten-induced malabsorption in celiac sprue. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 3(7): 687-94.

21. Sorensen, R., Kildal, E., Stepaniak, L., Pripp, A. H., and Sorhaug, T. 2004. Screening for peptides from fish and cheese inhibitory to prolyl endopeptidase. *Nahrung* 48(1): 53-56
22. Szwajcer-Dey, E., Rasmussen, J., Meldal, M., and Breddam, K. 1992. Proline-specific endopeptidases from microbial sources: isolation of enzyme from a *Xanthomonas* sp.. *J. Bacteriol.* 174: 2454-2459.
23. Tobiassen, R. O., Pripp, A. H., Stepaniak, L., and Sørhaug, T. 1996. Purification and characterization of an endopeptidase from *Propionibacterium freudenreichii*. *J. Dairy Sci.* 79:2129-2136.
24. Uchiyama, H., Inaoka, T., Ohykuma-Soyejima, T., Togame, Shibanaka, Y., Yoshimoto, T., and Kokubo, T. 2000. Directed evolution to improve the thermostability of prolyl endopeptidase. *J. Biochem.* 128: 441-447.
25. Wilk, S. 1983. Prolyl endopeptidase. *Life Sci.* 33:2149-2157.
26. Xiu, Z., Li, M., Zhou, S. Dou, H., Zhou, H., Chen, C. 2002. A new method for the

preparation of human parathyroid hormone 1-34 peptides. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 36(Pt2): 111-117.

27. Yoshimoto, T., Kado, K., Matsubara, F., Koriyama, N., Kaneto, H., and Tsuru, D. 1987. Specific inhibitors for prolyl endopeptidase and their anti-amnesic effect. *J. Pharmacobio-Dyn.* 10: 730-735.

28. Yoshimoto, T., Walter, R., and Tsuru, D. 1980. Proline-specific endopeptidase from *Flavobacterium*. *J. Biol. Chem.* 255: 4786-4792.

29. Yoshimoto, T., Kabashima, T., Fujii, M. 1998. Prolyl oligopeptidase and gene coding for the same. Japanese patent JP10066570.

100年3月2日修(更)正本

100年3月1日修正替換頁

## 補充序列表

<110> 財團法人食品工業發展研究所

<120> 具有碎葉鬼傘脯胺酸寡胜肽酶活性之蛋白質、編碼該蛋白質之核酸序列、生產該蛋白質之方法及其應用

<130> P84103

<160> 10

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成

<400> 1

tacggcggmt tcascatctc

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成

<400> 2

tgccaytcyt cwccraactc

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成

<400> 3

tacggcggat tcagcatctc

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成

<400> 4

tgccactcct caccaaactc

20

<210> 5

<211> 2508

<212> DNA

<213> 碎葉菌 (Coprinus clastophyllus)

<220>

<221> CDS

<222> (65)..(2284)

<400> 5

ccacagtctc ctctgtagac gcgtttggcc atccataact cgtcctcagc gtttctcgac 60

agct atg gtg acc aaa acc tgg gtt cct gac acg tat ccg caa gcc cgg 109

Met Val Thr Lys Thr Trp Val Pro Asp Thr Tyr Pro Gln Ala Arg

1 5 10 15

cgc tgc gac cac gtt gat acg tac acg agc gcc aaa cat ggc gag gtc 157

Arg Cys Asp His Val Asp Thr Tyr Thr Ser Ala Lys His Gly Glu Val

20 25 30

aag gtc gcg gac cct tat agg tgg atg gag gag tat acg gac gag acg 205

Lys Val Ala Asp Pro Tyr Arg Trp Met Glu Glu Tyr Thr Asp Glu Thr

35 40 45

gac aaa tgg acg tct gct cag gaa gcg tat aca cgc gcg tat atc gat	253
Asp Lys Trp Thr Ser Ala Gln Glu Ala Tyr Thr Arg Ala Tyr Ile Asp	
50 55 60	
aaa tac cct cat cgg cag cgg ttg gaa gat gcg ttc atg gcc agt ctg	301
Lys Tyr Pro His Arg Gln Arg Leu Glu Asp Ala Phe Met Ala Ser Leu	
65 70 75	
gac tat gcc agg gct ggt gca cca gtc aag agt gac aag aaa cgg tgg	349
Asp Tyr Ala Arg Ala Gly Ala Pro Val Lys Ser Asp Lys Lys Arg Trp	
80 85 90 95	
tac tgg tcc tat aac agc gga ttg cag cct cag aac gtt tac tac cgg	397
Tyr Trp Ser Tyr Asn Ser Gly Leu Gln Pro Gln Asn Val Tyr Tyr Arg	
100 105 110	
tcg agg gac gga caa cta cct gat agg tcc aaa ggg ctc gac aat gga	445
Ser Arg Asp Gly Gln Leu Pro Asp Arg Ser Lys Gly Leu Asp Asn Gly	
115 120 125	
gag gtc ttc atg gat atg aac ctc ctt tcg gag gac ggg aca gca gcc	493
Glu Val Phe Met Asp Met Asn Leu Leu Ser Glu Asp Gly Thr Ala Ala	
130 135 140	
atc agt gtc cac gcg ttc tct gac aat gga gag tac tac gcc tat ggt	541
Ile Ser Val His Ala Phe Ser Asp Asn Gly Glu Tyr Tyr Ala Tyr Gly	
145 150 155	
gta tca tac tcc gga agc gac ttc acc acc gtc tac att cgg cgg aca	589
Val Ser Tyr Ser Gly Ser Asp Phe Thr Thr Val Tyr Ile Arg Arg Thr	
160 165 170 175	
gac tct ccg cta gct tca aag gaa cag gcc gag aaa gac acc ggt cgt	637
Asp Ser Pro Leu Ala Ser Lys Glu Gln Ala Glu Lys Asp Thr Gly Arg	
180 185 190	
cta ccg gac gtt ctc aac tac gtt aaa ttt tcc tct ctt cgc tgg acg	685
Leu Pro Asp Val Leu Asn Tyr Val Lys Phe Ser Ser Leu Arg Trp Thr	
195 200 205	
cct gac tcg aag ggc ttc ttc tac cag aga tac ccg gac cac aat gga	733
Pro Asp Ser Lys Gly Phe Phe Tyr Gln Arg Tyr Pro Asp His Asn Gly	
210 215 220	

aac acc ggc tct gat aag cct agc gac tct gga att gag acc aga ggc Asn Thr Gly Ser Asp Lys Pro Ser Asp Ser Gly Ile Glu Thr Arg Gly 225 230 235	781
gat aag gac gcc atg ctt tat tat cat cgc gtt aac act cct caa tct Asp Lys Asp Ala Met Leu Tyr Tyr His Arg Val Asn Thr Pro Gln Ser 240 245 250 255	829
gag gat atc ctc gta tac tac gac aag acg aaa ccc gac tgg atg tac Glu Asp Ile Leu Val Tyr Tyr Asp Lys Thr Lys Pro Asp Trp Met Tyr 260 265 270	877
ggc atc gat gtt act gac gat gac aag tac gtc gtc atg agc gtt gtt Gly Ile Asp Val Thr Asp Asp Asp Lys Tyr Val Val Met Ser Val Val 275 280 285	925
cag gat act tcg agg aaa aat ctg ctt tgg ata gca gag ctc acg gac Gln Asp Thr Ser Arg Lys Asn Leu Leu Trp Ile Ala Glu Leu Thr Asp 290 295 300	973
gac ttc atc gag aag ggc ttc aaa tgg aac agg gtc atg gac aag ttt Asp Phe Ile Glu Lys Gly Phe Lys Trp Asn Arg Val Met Asp Lys Phe 305 310 315	1021
gac gct gaa tat gaa tat atc aag aat gag ggt cct gtc ttt gtc ctc Asp Ala Glu Tyr Glu Tyr Ile Lys Asn Glu Gly Pro Val Phe Val Leu 320 325 330 335	1069
cga acc aac gag aat gcg cca aaa tat aag gtg gtc acg gtg gac gtg Arg Thr Asn Glu Asn Ala Pro Lys Tyr Lys Val Val Thr Val Asp Val 340 345 350	1117
tcc aag gac aat gaa gtc aaa ccg ttc atc cct gag agt gac ggg ttc Ser Lys Asp Asn Glu Val Lys Pro Phe Ile Pro Glu Ser Asp Gly Phe 355 360 365	1165
ttg gag agc atc tac gcc gtc aac aag ggg aat aac ttt gtt gtc act Leu Glu Ser Ile Tyr Ala Val Asn Lys Gly Asn Asn Phe Val Val Thr 370 375 380	1213
tac aag cgg aat gtc aaa gat gag att tat gtc tac tcg aaa gag ggc Tyr Lys Arg Asn Val Lys Asp Glu Ile Tyr Val Tyr Ser Lys Glu Gly	1261



385	390	395	
aaa gaa ctc gaa cgg ctt gtt cct gat ttt atc ggt tca gct tca gta			1309
Lys Glu Leu Glu Arg Leu Val Pro Asp Phe Ile Gly Ser Ala Ser Val			
400	405	410	415
act gcg aga tgg gaa gat acc tgg ttc ttc atc aac tgc agc ggg ttc			1357
Thr Ala Arg Trp Glu Asp Thr Trp Phe Phe Ile Asn Cys Ser Gly Phe			
	420	425	430
aca acg ccc ggc acg att ggg cga tac gac ttt aca gcg cct gaa ggg			1405
Thr Thr Pro Gly Thr Ile Gly Arg Tyr Asp Phe Thr Ala Pro Glu Gly			
	435	440	445
cag cgg tgg agt acc tac cac caa act cag gtg aat ggt ctg aac ccg			1453
Gln Arg Trp Ser Thr Tyr His Gln Thr Gln Val Asn Gly Leu Asn Pro			
	450	455	460
gaa gag ttt gaa gca aga cag gac tgg tac gag agc aag gac ggg acc			1501
Glu Glu Phe Glu Ala Arg Gln Asp Trp Tyr Glu Ser Lys Asp Gly Thr			
	465	470	475
aag att cct atg ttc atc gtt cgt cac aag tcg acg cca ttt gat ggg			1549
Lys Ile Pro Met Phe Ile Val Arg His Lys Ser Thr Pro Phe Asp Gly			
	480	485	490
act gct cca gca gtc caa tac ggt tat ggc ggt ttc agc atc tca atc			1597
Thr Ala Pro Ala Val Gln Tyr Gly Tyr Gly Gly Phe Ser Ile Ser Ile			
	500	505	510
aac ccc ttc ttt agc ccg acc atc ctc act ttc ttg aag aca tac gga			1645
Asn Pro Phe Phe Ser Pro Thr Ile Leu Thr Phe Leu Lys Thr Tyr Gly			
	515	520	525
gca gtc tac gct gtt gcc aat atc aga ggg gga ggc gag ttt gga gag			1693
Ala Val Tyr Ala Val Ala Asn Ile Arg Gly Gly Gly Glu Phe Gly Glu			
	530	535	540
gag tgg cat gaa aat ggt atg agg gaa aag aag cac aat tgc ttt gac			1741
Glu Trp His Glu Asn Gly Met Arg Glu Lys Lys His Asn Cys Phe Asp			
	545	550	555
gac ttc atc gct gga gcc gag tat ctt gta aag agc aag tat gct gct			1789

Asp Phe Ile Ala Gly Ala Glu Tyr Leu Val Lys Ser Lys Tyr Ala Ala	
560	575
cca gga aaa gtc acc atc aat ggc ggg tcg aat gga ggt ctc ctt gtt	1837
Pro Gly Lys Val Thr Ile Asn Gly Gly Ser Asn Gly Gly Leu Leu Val	
580	590
tct gct tgc gtg aat cga gca ccc gaa ggc acg ttc ggt gct gca att	1885
Ser Ala Cys Val Asn Arg Ala Pro Glu Gly Thr Phe Gly Ala Ala Ile	
595	605
gcg gaa gtt ggt gta cat gat ttg ctt cga ttc cat aaa ttc aca atc	1933
Ala Glu Val Gly Val His Asp Leu Leu Arg Phe His Lys Phe Thr Ile	
610	620
gga cga gcc tgg ata agc gac tac ggt gac ccg gac gat cct aaa gac	1981
Gly Arg Ala Trp Ile Ser Asp Tyr Gly Asp Pro Asp Asp Pro Lys Asp	
625	635
ttt gac ttc atc tat cct atc tcg cca ctg cag aat gtc tcg ccc aca	2029
Phe Asp Phe Ile Tyr Pro Ile Ser Pro Leu Gln Asn Val Ser Pro Thr	
640	655
aag gtt cta ccg ccc tac atg ctc tca act gct gat cac gac gac cgt	2077
Lys Val Leu Pro Pro Tyr Met Leu Ser Thr Ala Asp His Asp Asp Arg	
660	670
gtc gta ccc agt cac tcg ttc aag atg gca gct act cta caa cat ctg	2125
Val Val Pro Ser His Ser Phe Lys Met Ala Ala Thr Leu Gln His Leu	
675	685
cga gcg aac aac cct agt cct att ctc ctg agg gtc gat aag aag gct	2173
Arg Ala Asn Asn Pro Ser Pro Ile Leu Leu Arg Val Asp Lys Lys Ala	
690	700
gga cat ggc gcc ggg aag tcg act aag aag agg gtc gaa gag tcg gcg	2221
Gly His Gly Ala Gly Lys Ser Thr Lys Lys Arg Val Glu Glu Ser Ala	
705	715
gat aag tgg agt ttt gtt gcg cag gct ttg ggc ttg gag tgg aaa gat	2269
Asp Lys Trp Ser Phe Val Ala Gln Ala Leu Gly Leu Glu Trp Lys Asp	
720	735

aaa gct aca ctc tag gtcctgggc tctgatgtct tgggattgcg gttgggtatc 2324  
Lys Ala Thr Leu

tcattgaggc gatattcggg ctttgacat ggcttccgca tggacatctg ttatacacga 2384

tttgctatcg ggttgtttat actgtagcta ctctactaat tggatgctca gcttgggtgca 2444

ggcgttgctg gtgcaatgic tgttttitaga aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2504

aaaa 2508

<210> 6

<211> 739

<212> PRT

<213> 碎葉菌 (Coprinus clastophyllus)

<400> 6

Met Val Thr Lys Thr Trp Val Pro Asp Thr Tyr Pro Gln Ala Arg Arg  
1 5 10 15

Cys Asp His Val Asp Thr Tyr Thr Ser Ala Lys His Gly Glu Val Lys  
20 25 30

Val Ala Asp Pro Tyr Arg Trp Met Glu Glu Tyr Thr Asp Glu Thr Asp  
35 40 45

Lys Trp Thr Ser Ala Gln Glu Ala Tyr Thr Arg Ala Tyr Ile Asp Lys  
50 55 60

Tyr Pro His Arg Gln Arg Leu Glu Asp Ala Phe Met Ala Ser Leu Asp  
65 70 75 80

Tyr Ala Arg Ala Gly Ala Pro Val Lys Ser Asp Lys Lys Arg Trp Tyr  
85 90 95

Trp Ser Tyr Asn Ser Gly Leu Gln Pro Gln Asn Val Tyr Tyr Arg Ser  
 100 105 110

Arg Asp Gly Gln Leu Pro Asp Arg Ser Lys Gly Leu Asp Asn Gly Glu  
 115 120 125

Val Phe Met Asp Met Asn Leu Leu Ser Glu Asp Gly Thr Ala Ala Ile  
 130 135 140

Ser Val His Ala Phe Ser Asp Asn Gly Glu Tyr Tyr Ala Tyr Gly Val  
 145 150 155 160

Ser Tyr Ser Gly Ser Asp Phe Thr Thr Val Tyr Ile Arg Arg Thr Asp  
 165 170 175

Ser Pro Leu Ala Ser Lys Glu Gln Ala Glu Lys Asp Thr Gly Arg Leu  
 180 185 190

Pro Asp Val Leu Asn Tyr Val Lys Phe Ser Ser Leu Arg Trp Thr Pro  
 195 200 205

Asp Ser Lys Gly Phe Phe Tyr Gln Arg Tyr Pro Asp His Asn Gly Asn  
 210 215 220

Thr Gly Ser Asp Lys Pro Ser Asp Ser Gly Ile Glu Thr Arg Gly Asp  
 225 230 235 240

Lys Asp Ala Met Leu Tyr Tyr His Arg Val Asn Thr Pro Gln Ser Glu  
 245 250 255

Asp Ile Leu Val Tyr Tyr Asp Lys Thr Lys Pro Asp Trp Met Tyr Gly  
 260 265 270

Ile Asp Val Thr Asp Asp Asp Lys Tyr Val Val Met Ser Val Val Gln  
 275 280 285

Asp Thr Ser Arg Lys Asn Leu Leu Trp Ile Ala Glu Leu Thr Asp Asp  
 290 295 300

Phe Ile Glu Lys Gly Phe Lys Trp Asn Arg Val Met Asp Lys Phe Asp  
 305 310 315 320

Ala Glu Tyr Glu Tyr Ile Lys Asn Glu Gly Pro Val Phe Val Leu Arg  
 325 330 335

Thr Asn Glu Asn Ala Pro Lys Tyr Lys Val Val Thr Val Asp Val Ser  
 340 345 350

Lys Asp Asn Glu Val Lys Pro Phe Ile Pro Glu Ser Asp Gly Phe Leu  
 355 360 365

Glu Ser Ile Tyr Ala Val Asn Lys Gly Asn Asn Phe Val Val Thr Tyr  
 370 375 380

Lys Arg Asn Val Lys Asp Glu Ile Tyr Val Tyr Ser Lys Glu Gly Lys  
 385 390 395 400

Glu Leu Glu Arg Leu Val Pro Asp Phe Ile Gly Ser Ala Ser Val Thr  
 405 410 415

Ala Arg Trp Glu Asp Thr Trp Phe Phe Ile Asn Cys Ser Gly Phe Thr  
 420 425 430

Thr Pro Gly Thr Ile Gly Arg Tyr Asp Phe Thr Ala Pro Glu Gly Gln

435

440

445

Arg Trp Ser Thr Tyr His Gln Thr Gln Val Asn Gly Leu Asn Pro Glu  
 450 455 460

Glu Phe Glu Ala Arg Gln Asp Trp Tyr Glu Ser Lys Asp Gly Thr Lys  
 465 470 475 480

Ile Pro Met Phe Ile Val Arg His Lys Ser Thr Pro Phe Asp Gly Thr  
 485 490 495

Ala Pro Ala Val Gln Tyr Gly Tyr Gly Gly Phe Ser Ile Ser Ile Asn  
 500 505 510

Pro Phe Phe Ser Pro Thr Ile Leu Thr Phe Leu Lys Thr Tyr Gly Ala  
 515 520 525

Val Tyr Ala Val Ala Asn Ile Arg Gly Gly Gly Glu Phe Gly Glu Glu  
 530 535 540

Trp His Glu Asn Gly Met Arg Glu Lys Lys His Asn Cys Phe Asp Asp  
 545 550 555 560

Phe Ile Ala Gly Ala Glu Tyr Leu Val Lys Ser Lys Tyr Ala Ala Pro  
 565 570 575

Gly Lys Val Thr Ile Asn Gly Gly Ser Asn Gly Gly Leu Leu Val Ser  
 580 585 590

Ala Cys Val Asn Arg Ala Pro Glu Gly Thr Phe Gly Ala Ala Ile Ala  
 595 600 605

Glu Val Gly Val His Asp Leu Leu Arg Phe His Lys Phe Thr Ile Gly  
 610 615 620

Arg Ala Trp Ile Ser Asp Tyr Gly Asp Pro Asp Asp Pro Lys Asp Phe  
 625 630 635 640

Asp Phe Ile Tyr Pro Ile Ser Pro Leu Gln Asn Val Ser Pro Thr Lys  
 645 650 655

Val Leu Pro Pro Tyr Met Leu Ser Thr Ala Asp His Asp Asp Arg Val  
 660 665 670

Val Pro Ser His Ser Phe Lys Met Ala Ala Thr Leu Gln His Leu Arg  
 675 680 685

Ala Asn Asn Pro Ser Pro Ile Leu Leu Arg Val Asp Lys Lys Ala Gly  
 690 695 700

His Gly Ala Gly Lys Ser Thr Lys Lys Arg Val Glu Glu Ser Ala Asp  
 705 710 715 720

Lys Trp Ser Phe Val Ala Gln Ala Leu Gly Leu Glu Trp Lys Asp Lys  
 725 730 735

Ala Thr Leu

<210> 7  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工合成

<400> 7  
atggtgacca aaacctgggt 20

<210> 8  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工合成

<400> 8  
ctagagtgta gctttatctt tc 22

<210> 9  
<211> 2289  
<212> DNA  
<213> 碎葉菌 (Coprinus clastophyllus)

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(2289)

<400> 9  
atg gtg acc aaa acc tgg gtt cct gac acg tat ccg caa gcc cgg cgc 48  
Met Val Thr Lys Thr Trp Val Pro Asp Thr Tyr Pro Gln Ala Arg Arg  
1 5 10 15

tgc gac cac gtt gat acg tac acg agc gcc aaa cat ggc gag gtc aag 96  
Cys Asp His Val Asp Thr Tyr Thr Ser Ala Lys His Gly Glu Val Lys  
20 25 30

gtc gcg gac cct tat agg tgg atg gag gag tat acg gac gag acg gac 144  
Val Ala Asp Pro Tyr Arg Trp Met Glu Glu Tyr Thr Asp Glu Thr Asp  
35 40 45

aaa tgg acg tct gct cag gaa gcg tat aca cgc gcg tat atc gat aaa 192  
Lys Trp Thr Ser Ala Gln Glu Ala Tyr Thr Arg Ala Tyr Ile Asp Lys  
50 55 60



tac cct cat cgg cag cgg ttg gaa gat gcg ttc atg gcc agt ctg gac	240
Tyr Pro His Arg Gln Arg Leu Glu Asp Ala Phe Met Ala Ser Leu Asp	
65    70    75    80	
tat gcc agg gct ggt gca cca gtc aag agt gac aag aaa cgg tgg tac	288
Tyr Ala Arg Ala Gly Ala Pro Val Lys Ser Asp Lys Lys Arg Trp Tyr	
85    90    95	
tgg tcc tat aac agc gga ttg cag cct cag aac gtt tac tac cgg tcg	336
Trp Ser Tyr Asn Ser Gly Leu Gln Pro Gln Asn Val Tyr Tyr Arg Ser	
100    105    110	
agg gac gga caa cta cct gat agg tcc aaa ggg ctc gac aat gga gag	384
Arg Asp Gly Gln Leu Pro Asp Arg Ser Lys Gly Leu Asp Asn Gly Glu	
115    120    125	
gtc ttc atg gat atg aac ctc ctt tcg gag gac ggg aca gca gcc atc	432
Val Phe Met Asp Met Asn Leu Leu Ser Glu Asp Gly Thr Ala Ala Ile	
130    135    140	
agt gtc cac gcg ttc tct gac aat gga gag tac tac gcc tat ggt gta	480
Ser Val His Ala Phe Ser Asp Asn Gly Glu Tyr Tyr Ala Tyr Gly Val	
145    150    155    160	
tca tac tcc gga agc gac ttc acc acc gtc tam att cgg cgg aca gac	528
Ser Tyr Ser Gly Ser Asp Phe Thr Thr Val Xaa Ile Arg Arg Thr Asp	
165    170    175	
tct ccg cta gct tca aag gaa cag gcc gag aaa gac acc ggt cgt cta	576
Ser Pro Leu Ala Ser Lys Glu Gln Ala Glu Lys Asp Thr Gly Arg Leu	
180    185    190	
ccg gac gtt ctc aac tac gtt aaa ttt tcc tct ctt cgc tgg acg cct	624
Pro Asp Val Leu Asn Tyr Val Lys Phe Ser Ser Leu Arg Trp Thr Pro	
195    200    205	
gac tcg aag ggc ttc ttc tac cag aga tac ccg gac cac aat gga aac	672
Asp Ser Lys Gly Phe Phe Tyr Gln Arg Tyr Pro Asp His Asn Gly Asn	
210    215    220	
acc ggc tct gat aag cct agc gac tct gga att gag acc aga ggc gat	720
Thr Gly Ser Asp Lys Pro Ser Asp Ser Gly Ile Glu Thr Arg Gly Asp	

225	230	235	240	
aag gac gcc atg ctt tat tat cat cgc gtt aac act cct caa tct gag				768
Lys Asp Ala Met Leu Tyr Tyr His Arg Val Asn Thr Pro Gln Ser Glu				
	245	250	255	
gat atc ctc gta tac tac gac aag acg aaa ccc gac tgg atg tac ggc				816
Asp Ile Leu Val Tyr Tyr Asp Lys Thr Lys Pro Asp Trp Met Tyr Gly				
	260	265	270	
atc gat gtt act gac gat gac aag tac gtc gtc atg agc gtt gtt cag				864
Ile Asp Val Thr Asp Asp Asp Lys Tyr Val Val Met Ser Val Val Gln				
	275	280	285	
gat act tcg agg aaa aat ctg ctt tgg ata gca gag ctc acg gac gac				912
Asp Thr Ser Arg Lys Asn Leu Leu Trp Ile Ala Glu Leu Thr Asp Asp				
	290	295	300	
ttc atc gag aag ggc ttc aaa tgg aac agg gtc atg gac aag ttt gac				960
Phe Ile Glu Lys Gly Phe Lys Trp Asn Arg Val Met Asp Lys Phe Asp				
	305	310	315	320
gct gaa tat gaa tat atc aag aat gag ggt cct gtc ttt gtc ctc cga				1008
Ala Glu Tyr Glu Tyr Ile Lys Asn Glu Gly Pro Val Phe Val Leu Arg				
	325	330	335	
acc aac gag aat gcg cca aaa tat aag gtg gtc acg gtg gac gtg tcc				1056
Thr Asn Glu Asn Ala Pro Lys Tyr Lys Val Val Thr Val Asp Val Ser				
	340	345	350	
aag gac aat gaa gtc aaa ccg ttc atc cct gag agt gac ggg ttc ttg				1104
Lys Asp Asn Glu Val Lys Pro Phe Ile Pro Glu Ser Asp Gly Phe Leu				
	355	360	365	
gag agc atc tac gcc gtc aac aag ggg aat aac ttt gtt gtc act tac				1152
Glu Ser Ile Tyr Ala Val Asn Lys Gly Asn Asn Phe Val Val Thr Tyr				
	370	375	380	
aag cgg aat gtc aaa gat gag att tat gtc tac tcg aaa gag ggc aaa				1200
Lys Arg Asn Val Lys Asp Glu Ile Tyr Val Tyr Ser Lys Glu Gly Lys				
	385	390	395	400
gaa ctc gaa cgg ctt gtt cct gat ttt atc ggt tca gct tca gta act				1248

Glu Leu Glu Arg Leu Val Pro Asp Phe Ile Gly Ser Ala Ser Val Thr	
405	410
415	
gcg aga tgg gaa gat acc tgg ttc ttc atc aac tgc agc ggg ttc aca	1296
Ala Arg Trp Glu Asp Thr Trp Phe Phe Ile Asn Cys Ser Gly Phe Thr	
420	425
430	
acg ccc ggc acg att ggg cga tac gac ttt aca gcg cct gaa ggg cag	1344
Thr Pro Gly Thr Ile Gly Arg Tyr Asp Phe Thr Ala Pro Glu Gly Gln	
435	440
445	
cgg tgg agt acc tac cac caa act cag gtg aat ggt ctg aac ccg gaa	1392
Arg Trp Ser Thr Tyr His Gln Thr Gln Val Asn Gly Leu Asn Pro Glu	
450	455
460	
gag ttt gaa gca aga cag gac tgg tac gag agc aag gac ggg acc aag	1440
Glu Phe Glu Ala Arg Gln Asp Trp Tyr Glu Ser Lys Asp Gly Thr Lys	
465	470
475	480
att cct atg ttc atc gtt cgt cac aag tcg acg cca ttt gat ggg act	1488
Ile Pro Met Phe Ile Val Arg His Lys Ser Thr Pro Phe Asp Gly Thr	
485	490
495	
gct cca gca gtc caa tac ggt tat ggc ggt ttc agc atc tca atc aac	1536
Ala Pro Ala Val Gln Tyr Gly Tyr Gly Gly Phe Ser Ile Ser Ile Asn	
500	505
510	
ccc ttc ttt agc ccg acc atc ctc act ttc ttg aag aca tac gga gca	1584
Pro Phe Phe Ser Pro Thr Ile Leu Thr Phe Leu Lys Thr Tyr Gly Ala	
515	520
525	
gtc tac gct gtt gcc aat atc aga ggg gga ggc gag ttt gga gag gag	1632
Val Tyr Ala Val Ala Asn Ile Arg Gly Gly Gly Glu Phe Gly Glu Glu	
530	535
540	
tgg cat gaa aat ggt atg agg gaa aag aag cac aat tgc ttt gac gac	1680
Trp His Glu Asn Gly Met Arg Glu Lys Lys His Asn Cys Phe Asp Asp	
545	550
555	560
ttc atc gct gga gcc gag tat ctt gta aag agc aag tat gct gct cca	1728
Phe Ile Ala Gly Ala Glu Tyr Leu Val Lys Ser Lys Tyr Ala Ala Pro	
565	570
575	

gga aaa gtc acc atc aat ggc ggg tcg aat gga ggt ctc ctt gtt tct	1776
Gly Lys Val Thr Ile Asn Gly Gly Ser Asn Gly Gly Leu Leu Val Ser	
580 585 590	
gct tgc gtg aat cga gca ccc gaa ggc acg ttc ggt gct gca att gcg	1824
Ala Cys Val Asn Arg Ala Pro Glu Gly Thr Phe Gly Ala Ala Ile Ala	
595 600 605	
gaa gtt ggt gta cat gat ttg ctt cga ttc cat aaa ttc aca atc gga	1872
Glu Val Gly Val His Asp Leu Leu Arg Phe His Lys Phe Thr Ile Gly	
610 615 620	
cga gcc tgg ata agc gac tac ggt gac ccg gac gat cct aaa gac ttt	1920
Arg Ala Trp Ile Ser Asp Tyr Gly Asp Pro Asp Asp Pro Lys Asp Phe	
625 630 635 640	
gac ttc atc tat cct atc tcg cca ctg cag aat gtc tcg ccc aca aag	1968
Asp Phe Ile Tyr Pro Ile Ser Pro Leu Gln Asn Val Ser Pro Thr Lys	
645 650 655	
gtt cta ccg ccc tac atg ctc tca act gct gat cac gac gac cgt gtc	2016
Val Leu Pro Pro Tyr Met Leu Ser Thr Ala Asp His Asp Asp Arg Val	
660 665 670	
gta ccc agt cac tcg ttc aag atg gca gct act cta caa cat ctg cga	2064
Val Pro Ser His Ser Phe Lys Met Ala Ala Thr Leu Gln His Leu Arg	
675 680 685	
gcg aac aac cct agt cct att ctc ctg agg gtg gat aag aag gct gga	2112
Ala Asn Asn Pro Ser Pro Ile Leu Leu Arg Val Asp Lys Lys Ala Gly	
690 695 700	
cat ggc gcc ggg aag tcg act aag aag agg gtc gaa gag tcg gcg gat	2160
His Gly Ala Gly Lys Ser Thr Lys Lys Arg Val Glu Glu Ser Ala Asp	
705 710 715 720	
aag tgg agt ttt gtt gcg cag gct ttg ggc ttg gag tgg aaa gat aaa	2208
Lys Trp Ser Phe Val Ala Gln Ala Leu Gly Leu Glu Trp Lys Asp Lys	
725 730 735	
gct aca cta agg gcg agc tca gat ccg gct gct aac aaa gcc cga aag	2256
Ala Thr Leu Arg Ala Ser Ser Asp Pro Ala Ala Asn Lys Ala Arg Lys	
740 745 750	

gaa gct gag ttg gct gct gcc acc gct gag caa  
 Glu Ala Glu Leu Ala Ala Ala Thr Ala Glu Gln  
           755                          760

2289

<210> 10  
 <211> 763  
 <212> PRT  
 <213> 碎葉菌 (Coprinus clastophyllus)  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (171)..(171)  
 <223> The 'Xaa' at location 171 stands for Tyr.  
 <400> 10

Met Val Thr Lys Thr Trp Val Pro Asp Thr Tyr Pro Gln Ala Arg Arg  
 1                  5                          10                          15

Cys Asp His Val Asp Thr Tyr Thr Ser Ala Lys His Gly Glu Val Lys  
                   20                          25                          30

Val Ala Asp Pro Tyr Arg Trp Met Glu Glu Tyr Thr Asp Glu Thr Asp  
                   35                          40                          45

Lys Trp Thr Ser Ala Gln Glu Ala Tyr Thr Arg Ala Tyr Ile Asp Lys  
           50                          55                          60

Tyr Pro His Arg Gln Arg Leu Glu Asp Ala Phe Met Ala Ser Leu Asp  
 65                          70                          75                          80

Tyr Ala Arg Ala Gly Ala Pro Val Lys Ser Asp Lys Lys Arg Trp Tyr  
                           85                          90                          95

Trp Ser Tyr Asn Ser Gly Leu Gln Pro Gln Asn Val Tyr Tyr Arg Ser

100

105

110

Arg Asp Gly Gln Leu Pro Asp Arg Ser Lys Gly Leu Asp Asn Gly Glu  
 115 120 125

Val Phe Met Asp Met Asn Leu Leu Ser Glu Asp Gly Thr Ala Ala Ile  
 130 135 140

Ser Val His Ala Phe Ser Asp Asn Gly Glu Tyr Tyr Ala Tyr Gly Val  
 145 150 155 160

Ser Tyr Ser Gly Ser Asp Phe Thr Thr Val Xaa Ile Arg Arg Thr Asp  
 165 170 175

Ser Pro Leu Ala Ser Lys Glu Gln Ala Glu Lys Asp Thr Gly Arg Leu  
 180 185 190

Pro Asp Val Leu Asn Tyr Val Lys Phe Ser Ser Leu Arg Trp Thr Pro  
 195 200 205

Asp Ser Lys Gly Phe Phe Tyr Gln Arg Tyr Pro Asp His Asn Gly Asn  
 210 215 220

Thr Gly Ser Asp Lys Pro Ser Asp Ser Gly Ile Glu Thr Arg Gly Asp  
 225 230 235 240

Lys Asp Ala Met Leu Tyr Tyr His Arg Val Asn Thr Pro Gln Ser Glu  
 245 250 255

Asp Ile Leu Val Tyr Tyr Asp Lys Thr Lys Pro Asp Trp Met Tyr Gly  
 260 265 270

Ile Asp Val Thr Asp Asp Asp Lys Tyr Val Val Met Ser Val Val Gln  
 275 280 285

Asp Thr Ser Arg Lys Asn Leu Leu Trp Ile Ala Glu Leu Thr Asp Asp  
 290 295 300

Phe Ile Glu Lys Gly Phe Lys Trp Asn Arg Val Met Asp Lys Phe Asp  
 305 310 315 320

Ala Glu Tyr Glu Tyr Ile Lys Asn Glu Gly Pro Val Phe Val Leu Arg  
 325 330 335

Thr Asn Glu Asn Ala Pro Lys Tyr Lys Val Val Thr Val Asp Val Ser  
 340 345 350

Lys Asp Asn Glu Val Lys Pro Phe Ile Pro Glu Ser Asp Gly Phe Leu  
 355 360 365

Glu Ser Ile Tyr Ala Val Asn Lys Gly Asn Asn Phe Val Val Thr Tyr  
 370 375 380

Lys Arg Asn Val Lys Asp Glu Ile Tyr Val Tyr Ser Lys Glu Gly Lys  
 385 390 395 400

Glu Leu Glu Arg Leu Val Pro Asp Phe Ile Gly Ser Ala Ser Val Thr  
 405 410 415

Ala Arg Trp Glu Asp Thr Trp Phe Phe Ile Asn Cys Ser Gly Phe Thr  
 420 425 430

Thr Pro Gly Thr Ile Gly Arg Tyr Asp Phe Thr Ala Pro Glu Gly Gln  
 435 440 445

Arg Trp Ser Thr Tyr His Gln Thr Gln Val Asn Gly Leu Asn Pro Glu  
450 455 460

Glu Phe Glu Ala Arg Gln Asp Trp Tyr Glu Ser Lys Asp Gly Thr Lys  
465 470 475 480

Ile Pro Met Phe Ile Val Arg His Lys Ser Thr Pro Phe Asp Gly Thr  
485 490 495

Ala Pro Ala Val Gln Tyr Gly Tyr Gly Gly Phe Ser Ile Ser Ile Asn  
500 505 510

Pro Phe Phe Ser Pro Thr Ile Leu Thr Phe Leu Lys Thr Tyr Gly Ala  
515 520 525

Val Tyr Ala Val Ala Asn Ile Arg Gly Gly Gly Glu Phe Gly Glu Glu  
530 535 540

Trp His Glu Asn Gly Met Arg Glu Lys Lys His Asn Cys Phe Asp Asp  
545 550 555 560

Phe Ile Ala Gly Ala Glu Tyr Leu Val Lys Ser Lys Tyr Ala Ala Pro  
565 570 575

Gly Lys Val Thr Ile Asn Gly Gly Ser Asn Gly Gly Leu Leu Val Ser  
580 585 590

Ala Cys Val Asn Arg Ala Pro Glu Gly Thr Phe Gly Ala Ala Ile Ala  
595 600 605

Glu Val Gly Val His Asp Leu Leu Arg Phe His Lys Phe Thr Ile Gly  
610 615 620



Arg Ala Trp Ile Ser Asp Tyr Gly Asp Pro Asp Asp Pro Lys Asp Phe  
625                                  630                                  635                                  640

Asp Phe Ile Tyr Pro Ile Ser Pro Leu Gln Asn Val Ser Pro Thr Lys  
                                645                                  650                                  655

Val Leu Pro Pro Tyr Met Leu Ser Thr Ala Asp His Asp Asp Arg Val  
                                660                                  665                                  670

Val Pro Ser His Ser Phe Lys Met Ala Ala Thr Leu Gln His Leu Arg  
                                675                                  680                                  685

Ala Asn Asn Pro Ser Pro Ile Leu Leu Arg Val Asp Lys Lys Ala Gly  
                                690                                  695                                  700

His Gly Ala Gly Lys Ser Thr Lys Lys Arg Val Glu Glu Ser Ala Asp  
705                                  710                                  715                                  720

Lys Trp Ser Phe Val Ala Gln Ala Leu Gly Leu Glu Trp Lys Asp Lys  
                                725                                  730                                  735

Ala Thr Leu Arg Ala Ser Ser Asp Pro Ala Ala Asn Lys Ala Arg Lys  
                                740                                  745                                  750

Glu Ala Glu Leu Ala Ala Ala Thr Ala Glu Gln  
                                755                                  760

## 公告本

101.10.29  
年 月 日修(更)正本

101年10月29日替換頁

## 十、申請專利範圍：

1、一種經分離的核酸分子，其係選自由下列：

(a)由以下：

(a-i) 以 SEQ ID NO:1 及 SEQ ID NO:2 作為引子並以財團法人食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心寄存編號 BCRC 36074 碎葉鬼傘之 DNA 作為模板 DNA，擴增出一長度為 128 鹽基之擴增片段；

(a-ii) 齊備包括有該擴增片段之探針；選殖該擴增片段，以獲取一質體；

(a-iii) 齊備一碎葉鬼傘互補 DNA 文庫；及

(a-iv) 以前述探針對前述碎葉鬼傘互補 DNA 文庫進行溶菌斑雜合；

之步驟所獲取之全長 2,508 nt，在第 65 nt 開始有一個 2,217 nt 之 ORF，編碼 739 個胺基酸，且該 739 個胺基酸之分子量為 83.9 kD 並構成一具有碎葉鬼傘脯胺酸寡胜肽酶活性之蛋白質的核酸分子；

(b)在 FastHyb 溶液中於 50°C 下反應 16 小時；以適量 2 X SSC, 0.1 % SDS 溶液於室溫下沖洗五分鐘；如前一步驟再反覆沖洗一次；以 0.5 X SSC, 0.1 % SDS 溶液於 65 °C 下充分作用 15 分鐘；如前一步驟再反覆作用一次；之高度嚴格條件得以與前述核酸分子(a)雜合之核酸分子；及

(c)前述核酸分子(a)或核酸分子(b)之反義核酸分子；

所構成之群組。

2、一種經分離的蛋白質，其由申請專利範圍第1項所述核酸分子所編碼具有碎葉鬼傘脯胺酸寡胜肽酶活性之蛋白質。

3、一種經分離的核酸分子，其係選自由下列：

(a)由以下：

(a-i) 採用申請專利範圍第1項所述之核酸為模板，並採用 SEQ ID NO:7 之核酸序列及將 SEQ ID NO:8 去除其 5'端的「CTAG」等4個核酸後之核酸序列為引子，進行聚合酶連鎖反應以獲取一完整脯胺酸寡胜肽酶 cDNA；

(a-ii) 將前述完整脯胺酸寡胜肽酶 cDNA 接合於一表現載體，以構成一基因重組質體；

(a-iii) 將前述基因重組質體送入一第一大腸桿菌菌株；及

(a-iv) 培養帶有前述基因重組質體之第一大腸桿菌菌株以形成菌落；

之步驟自前述菌落中所取得，其較申請專利範圍第1項所述之核酸分子在 3'端缺少4個核酸鹽基，且編碼一具有碎葉鬼傘脯胺酸寡胜肽酶活性而在 C 端較申請專利範圍第2項所述之蛋白質多出24個胺基酸殘基即「R ASSDPAANKA RKEAELAAAT AEQ」胺基酸殘基之蛋白質的核酸分子；

(b)以 DH10B 大腸桿菌菌株為前述第一大腸桿菌菌株，如前述製得核酸分子(a)之步驟所製得的核酸分子；

(c)在 FastHyb 溶液中於 50°C 下反應 16 小時；以適量 2 X SSC, 0.1 % SDS 溶液於室溫下沖洗五分鐘；如前一步驟再反覆沖洗一次；以 0.5 X SSC, 0.1 % SDS 溶液於 65 °C 下充分作用 15 分鐘；如前一步驟再反覆作用一次；之高度嚴格條件得以與前述核酸分子(a)雜合之核酸分子；及

(d)前述核酸分子(b)、核酸分子(c)或核酸分子(d)之反義核酸分子；

所構成之群組。

4、一種經分離的蛋白質，其由申請專利範圍第 3 項所述核酸分子所編碼具有碎葉鬼傘脯胺酸寡胜肽酶活性之蛋白質。

5、如申請專利範圍第 4 項所述之蛋白質，其係將申請專利範圍第 3 項所述核酸分子送入一第二大腸桿菌菌株所表現具有碎葉鬼傘脯胺酸寡胜肽酶活性之蛋白質。

6、如申請專利範圍第 5 項所述之蛋白質，該第二大腸桿菌菌株係 BL21(DE3)。

7、一種經分離的蛋白質，其具有碎葉鬼傘脯胺酸寡胜肽酶活性而在 pH 7.0 係於 45°C 反應時表現出最高脯胺酸寡胜肽酵素酶活性，且在 pH 8.0 係於 37°C 反應時表現出最高脯胺酸寡胜肽酵素酶活性；

所述之蛋白質，其係由申請專利範圍第 1 項所述之核酸分子所編碼者。

8、如申請專利範圍第 7 項所述之蛋白質，其在 pH 6.0 時約有 90%脯胺酸寡胜肽酵素酶活性，且於 45°C 預熱 60 分

鐘後保有 67% 脯胺酸寡胜肽酵素酶活性。

9、一種經分離的蛋白質，其具有碎葉鬼傘脯胺酸寡胜肽酶活性而在 pH 7.0 係於 45°C 反應時表現出最高脯胺酸寡胜肽酵素酶活性，且在 pH 8.0 係於 37°C 反應時表現出最高脯胺酸寡胜肽酵素酶活性；

所述之蛋白質，其在 pH 6.0 時約有 90% 脯胺酸寡胜肽酵素酶活性，且於 45°C 預熱 60 分鐘後保有 67% 脯胺酸寡胜肽酵素酶活性；

所述之蛋白質，其係由申請專利範圍第 3 項所述之核酸分子所編碼者。

10、一種核酸構築體，其包括申請專利範圍第 1 項所述之核酸分子，且該核酸分子係可操作地連接到一控制序列，而該控制序列至能夠在特定細胞中驅動該核酸所編碼的蛋白。

11、一種核酸構築體，其包括申請專利範圍第 3 項所述之核酸分子，且該核酸分子係可操作地連接到一控制序列，而該控制序列至能夠在特定細胞中驅動該核酸所編碼的蛋白。

12、一種載體，其包括有如申請專利範圍第 1 項所述之核酸分子。

13、一種載體，其包括有如申請專利範圍第 3 項所述之核酸分子。

14、一種載體，其包括有如申請專利範圍第 10 項所述之核酸構築體。

15、一種載體，其包括有如申請專利範圍第 11 項所述之核酸構築體。

16、一種轉形株，其包括有如申請專利範圍第 12 至 15 項中任一項所述之載體。

17、如申請專利範圍第 16 項所述之轉形株，其係一 BL21(DE3)大腸桿菌菌株或 DH10B 大腸桿菌菌株。

18、一種具有解決因富含脯胺酸之麩質所引起腹瀉之功能的醫藥組成物，其含有如申請專利範圍第 2 及 7 至 9 項中任一項所述之蛋白質作為有效成分，並含有醫藥上可接受之賦形劑。

19、一種可配合具有脯胺酸殘基之前體藥物使用之藥學組成物，其含有至少一醫藥上可接受之賦形劑與如申請專利第 2 及 7 至 9 項中任一項所述之蛋白質，該蛋白質係作為有效成分以處理該前體藥物而使其成為一有功效藥物。

20、如申請專利範圍第 19 項所述之藥學組成物，其進一步含有一與前述蛋白質結合之抗體。

21、一種使用申請專利第 2 及 7 至 9 項中任一項所述之蛋白質之應用，其係用於製造純化回收異源性表現胜肽之回收處理劑。

22、一種生產具有脯胺酸寡胜肽酶活性之蛋白質之方法，其包括有以下步驟：

(a)提供申請專利範圍第 16 項所述之轉形株；

(b)在可令具有脯胺酸寡胜肽酶活性之蛋白質被表現之

環境下培養該轉形株；及

(c)進行純化以獲取該蛋白質。

23、一種生產具有脯胺酸寡胜肽酶活性之蛋白質之方法，其包括有以下步驟：

(a)提供申請專利範圍第 17 項所述之轉形株；

(b)在可令具有脯胺酸寡胜肽酶活性之蛋白質被表現之環境下培養該轉形株；及

(c)進行純化以獲取該蛋白質。

24、一種經分離的核酸分子，其係選自由下列：

(a)具有 SEQ ID NO:5 核酸序列或 SEQ ID NO:9 核酸序列之核酸分子；

(b)可藉由：在 FastHyb 溶液中於 50°C 下反應 16 小時；以適量 2 X SSC, 0.1 % SDS 溶液於室溫下沖洗五分鐘；如前一步驟再反覆沖洗一次；以 0.5 X SSC, 0.1 % SDS 溶液於 65 °C 下充分作用 15 分鐘；如前一步驟再反覆作用一次；之高度嚴格條件而得以與核酸分子(a)雜合之核酸分子；

(c)與前述核酸分子(a)或核酸分子(b)編碼具有相同胺基酸序列的蛋白質之核酸分子；及

(d)前述核酸分子(a)、核酸分子(b)或核酸分子(c)之反義核酸分子；

所構成之群組。

25、一種經分離的蛋白質，其係選自由下列：

(a)具有 SEQ ID NO:6 胺基酸序列或 SEQ ID NO:10 胺基

酸序列之蛋白質；

(b)由具有 SEQ ID NO:5 核酸序列或 SEQ ID NO:9 核酸序列之核酸分子所編碼之蛋白質；及

(c)可藉由：在 FastHyb 溶液中於 50°C 下反應 16 小時；以適量 2 X SSC, 0.1 % SDS 溶液於室溫下沖洗五分鐘；如前一步驟再反覆沖洗一次；以 0.5 X SSC, 0.1 % SDS 溶液於 65 °C 下充分作用 15 分鐘；如前一步驟再反覆作用一次；之高度嚴格條件而得以與具有 SEQ ID NO:5 核酸序列或 SEQ ID NO:9 核酸序列之核酸分子雜合之核酸分子所編碼，且具有碎葉鬼傘脯胺酸寡胜肽酶活性之蛋白質；

所構成之群組。

26、一種核酸構築體，其包括申請專利範圍第 24 項所述之核酸分子，且該核酸分子係可操作地連接到一控制序列，而該控制序列至能夠在特定細胞中驅動該核酸所編碼的蛋白。

27、一種載體，其包括有如申請專利範圍第 24 項所述之核酸分子。

28、一種載體，其包括有如申請專利範圍第 26 項所述之核酸構築體。

29、一種轉形株，其包括有如申請專利範圍第 27 或 28 項中任一項所述之載體。

30、如申請專利範圍第 29 項所述之轉形株，其係一 BL21(DE3)大腸桿菌菌株或 DH10B 大腸桿菌菌株。

31、一種具有解決因富含脯胺酸之麩質所引起腹瀉之



功能的醫藥組成物，其含有如申請專利範圍第 25 項所述之蛋白質作為有效成分，並含有醫藥上可接受之賦形劑。

32、一種可配合具有脯胺酸殘基之前體藥物使用之藥學組成物，其含有至少一醫藥上可接受之賦形劑與如申請專利第 25 項所述之蛋白質，該蛋白質係作為有效成分以處理該前體藥物而使其成為一有功效藥物。

33、如申請專利範圍第 32 項所述之藥學組成物，其進一步含有一與前述蛋白質結合之抗體。

34、一種使用申請專利第 25 項所述之蛋白質之應用，其係用於製造純化回收異源性表現胜肽之回收處理劑。

35、一種生產具有脯胺酸寡胜肽酶活性之蛋白質之方法，其包括有以下步驟：

(a)提供申請專利範圍第 29 項所述之轉形株；

(b)在可令具有脯胺酸寡胜肽酶活性之蛋白質被表現之環境下培養該轉形株；及

(c)進行純化以獲取該蛋白質。

36、一種生產具有脯胺酸寡胜肽酶活性之蛋白質之方法，其包括有以下步驟：

(a)提供申請專利範圍第 30 項所述之轉形株；

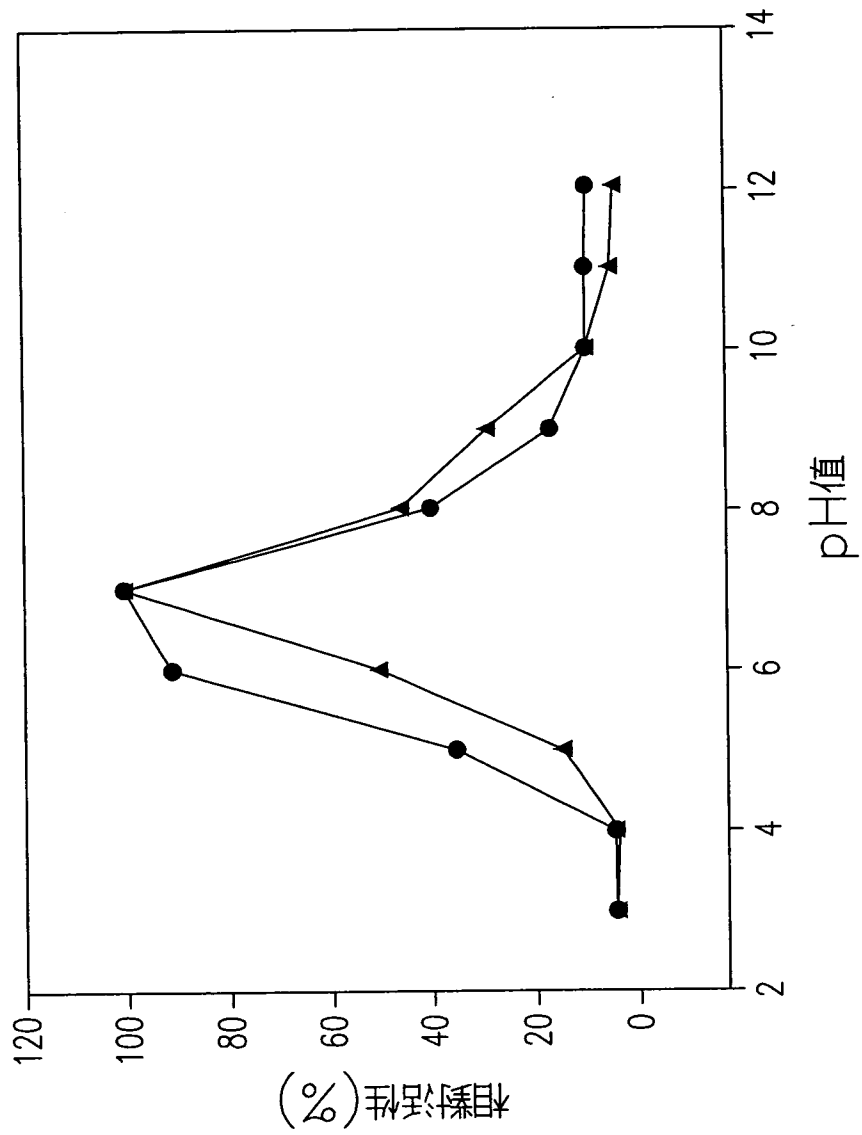
(b)在可令具有脯胺酸寡胜肽酶活性之蛋白質被表現之環境下培養該轉形株；及

(c)進行純化以獲取該蛋白質。

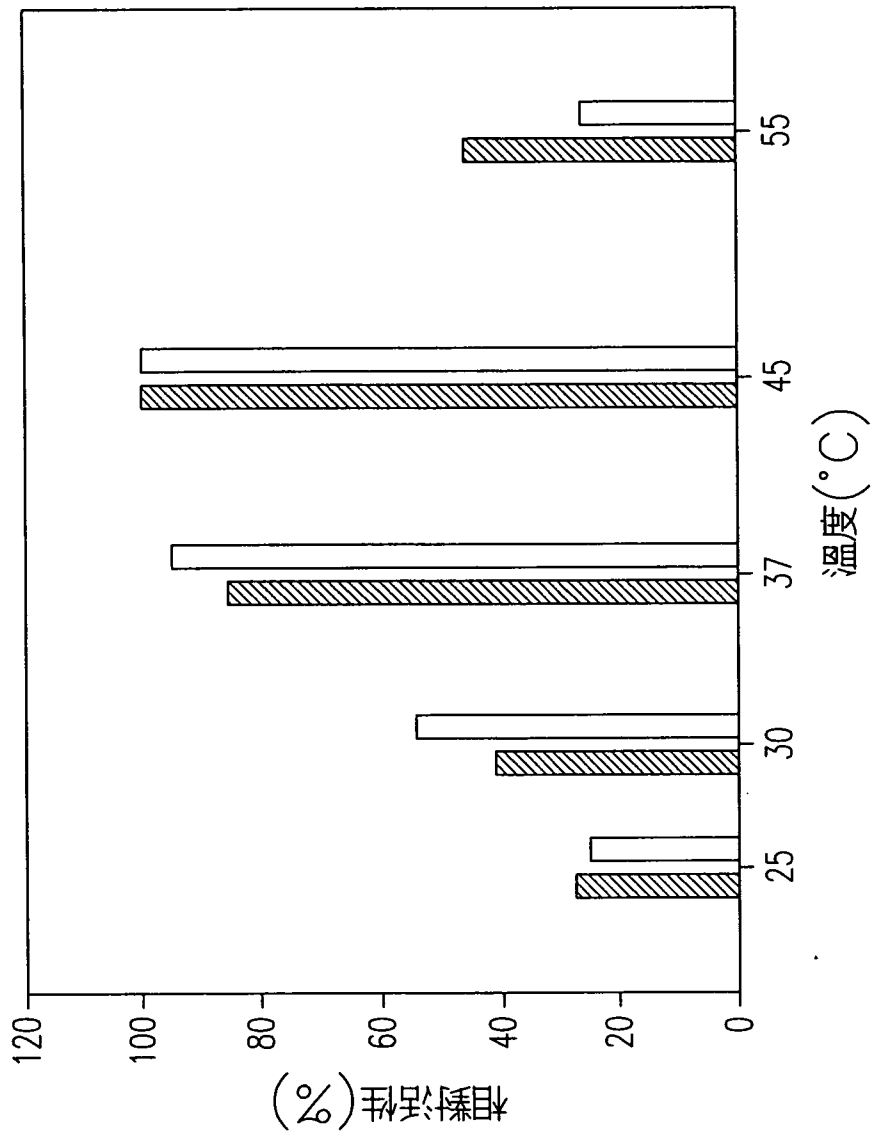
十一、圖式：

如次頁

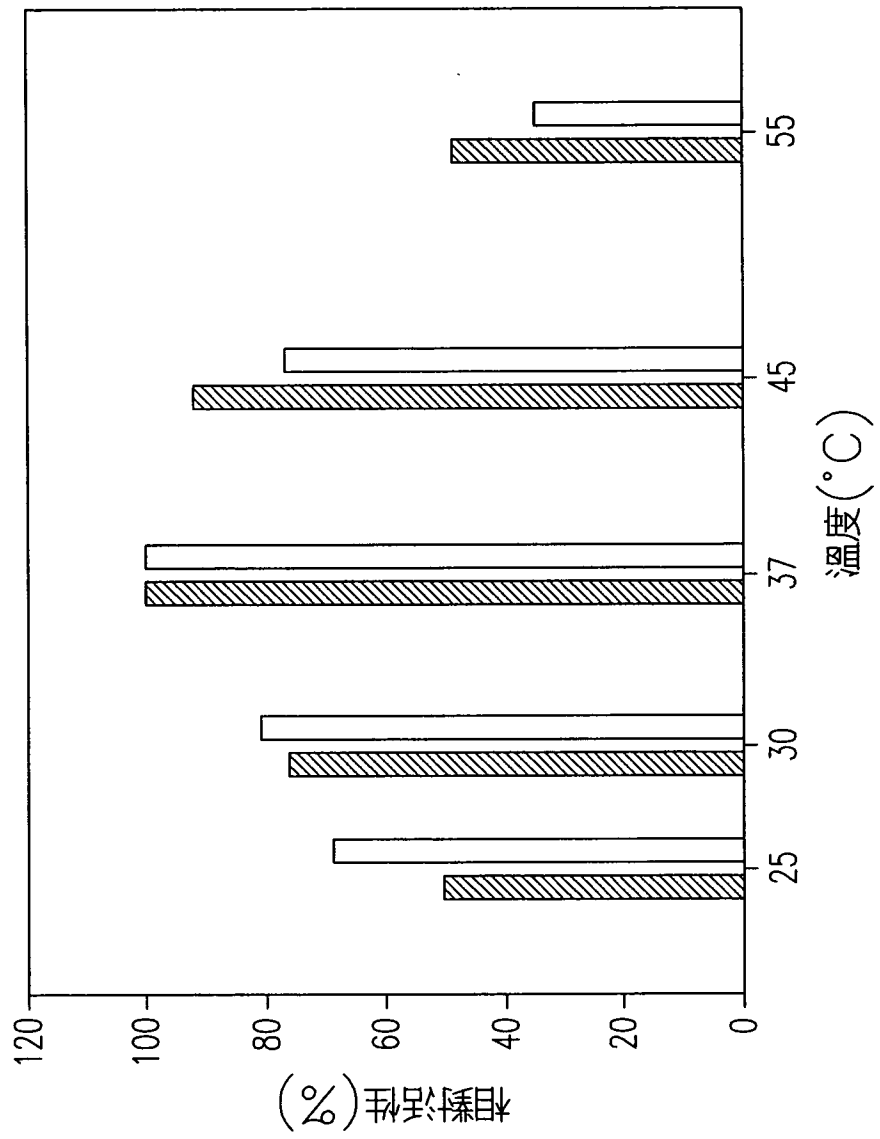
公告本



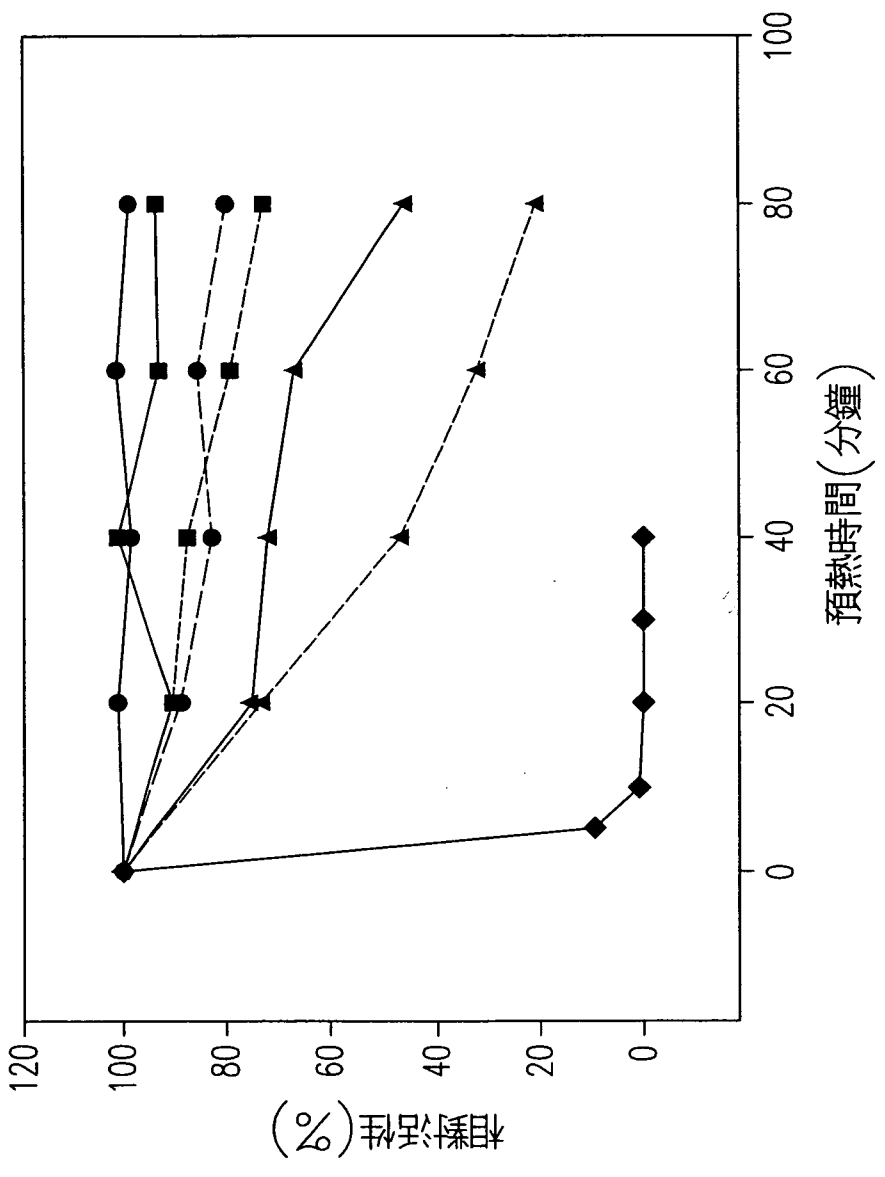
第一圖



第二圖



第三圖



第四圖