



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.
C12N 15/56 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0046639
(43) 공개일자 2007년05월03일

(21) 출원번호 10-2005-0103493
(22) 출원일자 2005년10월31일
심사청구일자 2005년10월31일

(71) 출원인 한국해양연구원
경기 안산시 상록구 사동 1270번지

(72) 발명자 이정현
경기 성남시 분당구 정자동 한솔청구아파트 116-101
강성균
경기 안양시 동안구 평촌동 75-1 대우아파트 112-506
김상진
경기 안산시 상록구 사2동 월드아파트 707-904
현정호
경기 성남시 분당구 수내2동 파크타운 대림아파트105-2001
권개경
경기 안산시 상록구 일동 579-3 2층
김윤재
경기 안산시 상록구 사동 1579-2 301호
이현숙
경기 안양시 동안구 평촌동 75-1 대우아파트 112-506
배승섭
경기 안산시 상록구 사동 1519-12 402호
임재규
경기 시흥시 정왕동 1575-9 203호
전정호
경기 안산시 상록구 사동 1579-2 301호
양성현
경기 안산시 단원구 초지동 그린빌 주공아파트 1509-904

(74) 대리인 윤여강
양부현
이문섭

전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 고희열성 메티오닐아미노펩티다아제 효소 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 고호열성 메티오닐아미노펩티다아제 효소 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, *Thermococcus* sp. 균주(KCTC 10859BP)로부터 분리되어진 신규의 고호열성 메티오닐아미노펩티다아제 및 이의 기능적 동등물, 이들을 암호화하는 신규의 유전자 및 이들의 생산방법을 제공한다. 본 발명에 따른 단백질 분해 효소는 고호열성이다.

대표도

도 3

특허청구의 범위

청구항 1.

Thermococcus sp. 균주(KCTC 10859BP)로부터 분리되어진 고호열성 메티오닐아미노펩티다아제 효소 및 이의 기능적 동등물.

청구항 2.

서열번호의 2의 아미노산 서열을 가진 단백질.

청구항 3.

서열번호 1의 유전자.

청구항 4.

서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 유전자.

청구항 5.

제 1 항에 따른 상기 고호열성 메티오닐아미노펩티다아제 효소를 암호화하는 핵산서열.

청구항 6.

제 5 항에 있어서, 서열번호 1의 상기 고호열성 메티오닐아미노펩티다아제 효소를 암호화하는 DNA 핵산서열.

청구항 7.

제 5 항에 있어서, 상기 고호열성 메티오닐아미노펩티다아제 효소를 암호화하는 DNA 핵산서열이 서열번호 1과 코돈 축퇴성에 의한 등가인 것을 특징으로 하는 핵산서열.

청구항 8.

제 1 항에 따른 고히열성 메티오닐아미노펩티다아제 효소가 서열번호 2를 가지는 것을 특징으로 하는 메티오닐아미노펩티다아제 효소.

청구항 9.

제 1 항에 따른 고히열성 메티오닐아미노펩티다아제 효소가 서열번호 2와 기능적으로 동등한 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 메티오닐아미노펩티다아제 효소.

청구항 10.

제 5 항 내지 제 7 항의 어느 한 항에 따른, 핵산서열을 포함하는 재조합백터.

청구항 11.

제 10 항에 있어서, 상기 재조합백터가 도 7에 기재된 개열지도를 가지는 것을 특징으로 하는 플라스미드.

청구항 12.

제 10 항에 따른 재조합 백터로 형질전환된 세포.

청구항 13.

균주 *Thermococcus* sp. NA1 (KCTC 10859BP) 또는 제 12 항에 따른 형질전환된 세포를 배양하고, 상기 배양된 세포로부터 메티오닐아미노펩티다아제 효소를 분리하는 것을 특징으로 하는 고히열성 메티오닐아미노펩티다아제 효소 생산방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

계놈의 연구의 최근의 진보는 막대한 양의 서열 정보를 생산했다. 종래의 유전자 공학 및 계놈의 연구 기술의 일반적인 조합과 함께, 몇몇의 고히열성 미생물의 계놈 서열은 생물 공학 분야에서 열에 강한 효소 때문에 관심을 받고 있으며, 많은 매우 열안정적 효소가 생물 공학의 목적으로 개발되고 있다.

메티오닐 아미노펩티다아제

메티오닐 아미노펩티다아제 (MetAP; EC 3.4.11.18)는 진행되지 않는 방식으로 발생초기의 폴리펩타이드 사슬로부터 N-말단 메티오닌 잔기의 가수분해적 제거가 가능한 독특한 종류의 프로테아제를 나타낸다. 이것은 원핵생물 및 진핵생물 모두에서 발견되는 도처에 존재하는 효소이며, 기능 조절, 세포내 타겟팅 및 단백질 재편성에 관계된 N-말단 변형을 위한 중요한 효소이다(Bradshaw et al., 1998; Lowther and Matthews, 2000; Prchal et al., 1986; Varshavsky, 1997).

서열 정렬 및 엑스레이 결정 데이터에 기초하여 MetAP는 두 가지 유형으로 나뉘어 지고(I 및 II 유형), II 유형 효소내에는 C-말단 도메인 내에 삽입된, 기능이 알려지지 않은 추가의 62 아미노산 나선형 서브도메인이 있다(Afrin et al., 1995). 세균은 오직 I 유형 MetAP 만을 갖으며, 고세균은 오직 II 유형만을 갖는다. 이와는 대조적으로 진핵생물은 I 유형 및 II 유형 MetAP의 둘 다를 갖는다(Bradshaw et al., 1998).

인식/결합체로서 기능할 것으로 보이고, 단백질-단백질, 단백질-DNA 또는 단백질-RNA 상호작용을 통하여 리보솜 또는 다른 세포내 동반자와 부착하는 N-말단 도메인 확장의 부존재(하부유형 a) 또는 존재(하부유형 b)에 의하여 이러한 효소들이 더욱더 분화되어진다. *E. coli* (Roderick and Matthews, 1993) 및 *Staphylococcus aureus*(Oefner et al., 2003)으로부터의 Ia 유형 MetAP, *Pyrococcus furiosus*(Tahirov et al., 1998)로부터의 IIa 유형 MetAP 및 *Homo sapiens*(Liu et al., 1998)로부터의 IIb 유형 MetAP 는 결정학기술에 의하여 특성규명이 되었고, 두 개의 금속이온은 엄격하게 보존된 잔기(두 개의 글루탐산, 두 개의 아스파르트산, 한 개의 히스티딘 및 두 개의 물 분자)와 배위결합되어 있는 유사한 촉매 도메인을 포함하는 것으로 보였다((Lowther et al., 1999).

고호열성 고세균에서는 *P. furiosus*로부터 단하나의 MetAP가 클론 되었고, 생화학적으로 특성이 규명되었다(Tsunasawa et al., 1997). *Thermococcaceae* 과에 속하는 *Thermococcus* 및 *Pyrococcus* 구성원들은 최적 성장 온도가 상당히 다름에도 불구하고, 게놈 크기, 유전자 밀도, 유전자의 수, GC 함량 같은 많은 게놈 특징을 공통으로 가지고 있다(Fukui et al., 2005).

Thermococcus spp.로부터의 대부분의 효소들은 *Pyrococcus* spp.로부터의 효소들보다 활성화에 대한 조금 낮은 최적온도를 나타내는 경향이 있는데, 이것은 아마도 두 속이 살고 있는 곳의 주변 온도에 기인하는 것으로 추정된다. 일반적으로 높은 유사성을 보여주는 두 속으로부터의 단백질들 간의 생화학적 차이는 고세균 단백질의 열안정성 기작을 이해하는 단서를 제공할 수 있으며 열안정성에 대하여 책임이 있는 잔기들을 확정적으로 알아 낼 수 있다.

경제적으로 가치가 있고 열에 극히 안정적인 효소들을 찾는 것을 촉진하고 특히 고온에서 성장하는 고호열성 고세균의 생리에 관한 해답을 찾기 위하여, 본 발명자들은 고호열성 고세균 *Thermococcus* sp. NA1 (Bae et al)을 분리하였고, 생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)에 2005년 10월 7일 기탁하여, KCTC 10859BP의 기탁번호를 부여받았다. 상기 균주의 전체 게놈 서열이 많은 유용한 극히 열적으로 안정한 효소를 찾기 위하여 결정되었다 (Lee et al). *Thermococcus* sp. NA1의 게놈 정보의 분석으로 열안정성 메티오닐아미노펩티다아제에 속하는 메티오닐아미노펩티다아제 유전자를 발견하였고, 상기 유전자를 클로닝하고, 이를 재조합백터를 이용하여 발현시키고, 정제하여, 효소적 활성을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 신규의 고호열성인 메티오닐아미노펩티다아제를 제공하는 것이다.

본 발명은 신규의 고호열성인 메티오닐아미노펩티다아제를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성

본 발명은 메티오닐아미노펩티다아제를 제조하는 방법을 제공한다. 상기 제조방법은 이에 제한되는 것은 아니나, 바람직하게는 유전공학적인 방법에 의한 제조방법이다.

본 발명은 메티오닐아미노펩티다아제를 암호화하는 분리된 DNA 서열 및 이들을 함유하는 재조합 백터를 제공한다.

제 1 양태로, 본 발명은 고온에서 안정한 메티오닐 아미노펩티다아제를 암호화하는 핵산서열 및 상기 서열에 등가의 핵산서열을 제공한다. 상기 핵산서열들은 보다 구체적으로는 서열번호 1이다.

"등가의 핵산서열"에는 상기 메티오닐 아미노펩티다아제 효소 서열의 코돈 축퇴성 서열을 포함한다.

"코돈 축퇴성 서열"이란 상기 자연 발생의 서열과는 상이하나 본 발명에 개시된 자연 발생의 메티오닐 아미노펩티다아제 효소와 동일한 서열의 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산서열을 의미한다.

제 2 양태로, 본 발명은 메티오닐 아미노펩티다아제를 제공한다. 보다 상세하게는 서열번호 2로 표시되는 메티오닐 아미노펩티다아제 및 이의 기능적 동등물을 제공한다.

본 발명의 "기능적 동등물"에는 서열번호 8의 메티오닐 아미노펩티다아제 중 일부 또는 전부가 치환되거나, 아미노산의 일부가 결실 또는 부가된 아미노산 서열 변형체가 포함된다. 아미노산의 치환은 바람직하게는 보존적 치환이다. 천연에 존재하는 아미노산의 보존적 치환의 예는 다음과 같다; 지방족 아미노산(Gly, Ala, Pro), 소수성 아미노산(Ile, Leu, Val), 방향족 아미노산(Phe, Tyr, Trp), 산성 아미노산(Asp, Glu), 염기성 아미노산(His, Lys, Arg, Gln, Asn) 및 황함유 아미노산(Cys, Met). 아미노산의 결실은 바람직하게는 메티오닐 아미노펩티다아제의 활성화에 직접 관여하지 않는 부분에 위치한다.

본 발명은, 제 3 양태로는 상기 메티오닐 아미노펩티다아제를 암호화하는 분리된 DNA 분절을 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

본 발명에서 사용되는 벡터라는 용어는 또다른 핵산을 그것에 결합시켜 이송시킬 수 있는 핵산 분자를 의미한다. 발현벡터란 용어는 상기 벡터에 의해 운반되는 각 재조합형 유전자에 의해 암호화되는 단백질을 합성시킬 수 있는 플라스미드, 코스미드 또는 파아지를 포함한다. 바람직한 벡터는 그것이 결합된 핵산을 자기 복제 및 발현시킬 수 있는 벡터이다.

본 발명의 제 4 양태로는, 상기 메티오닐 아미노펩티다아제를 암호화하는 분리된 DNA 분절을 포함하는 재조합벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.

본 발명에서 사용되는 '형질전환'이란 용어는 외래 DNA 또는 RNA가 세포에 흡수되어 세포의 유전형이 변화되는 것을 말한다.

적합한 형질전환세포로는 원핵생물, 곰팡이, 식물, 동물세포 등이 포함되나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 가장 바람직하게는 대장균을 이용한다.

본 발명의 제 5 양태로는 상기 형질전환 세포, 또는 상기 *Thermococcus* sp.를 이용하여 메티오닐 아미노펩티다아제를 생산하는 방법을 제공한다.

이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것으로 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[실시예 1] 메티오닐 아미노펩티다아제(MetAP) 유전자의 일차 구조 및 재조합 효소의 발현

(1) 균주 및 성장 조건

E. coli DH5a가 플라스미드 증식 및 핵산 서열분석을 위해 사용되었다. *E. coli* BL21-Codonplus(DE3)-RIL 세포(스트라타진, 라졸라, 캘리포니아) 및 플라스미드 pET-24a(+)(노바젠, 메이디슨, 위스콘신)이 유전자 발현을 위해 사용되었다. *E. coli* 균주는 37°C에서 루리아-베르타니(Luria-Bertani) 배지 안에서 배양되었고, 카나마이신이 최종농도 50µg/ml이 되도록 배지에 첨가되었다.

(2) DNA 조작 및 서열분석

DNA 조작은 샘브록 및 러셀에 의해 기술된 것처럼 표준적인 방법으로 행하여졌다. *Thermococcus* sp.의 게놈 DNA는 표준적인 방법으로 분리되었다. 제한효소 및 다른 변형시키는 효소는 프로메가(메이디슨, 위스콘신)으로부터 구매하였다. *E. coli* 세포로부터 플라스미드 DNA의 적은 양의 제조는 플라스미드 미니 키트(퀴아젠, 힐덴, 독일)을 이용하여 행하여졌다. DNA 서열분석은 빅다이 터미네이터 키트(PE Applied Biosystems, 포스터 시, 캘리포니아)를 이용하여 자동 서열분석기(AB3100)로 행하여졌다.

(3) MetAP 암호화 유전자의 클로닝 및 발현

NdeI 및 *SaI*에 의해 플랭크(flank)된 *Thermococcus* sp. NA1(TNA1-MetAP)의 메티오닐 아미노펩티다아제의 유전자의 전장 길이는 게놈 DNA와 두 개의 프라이머(센스 [[5'-CGACCCGGCATAATGGATGAAAGGGAGGCCCTCATAAAAG-3'; 서열번호 3] 및 안티센스 [5'-

CTCCACATGTCGACGGTGGTTATGTAAGCCCCCTCCTTC-3'; 서열번호 4]; 상기 센스 프라이머 안에 이탤릭화된 서열이 *NdeI* 사이트이고, 안티센스 프라이머 안에 이탤릭체로 된 서열이 *SaI*이다)를 이용하여 증폭되었다. 증폭되어진 서열은 *NdeI* 및 *SaI*로 다이제스트되었고, *NdeI/HindIII* 다이제스트된 pET-24a(+)에 연결되었다. 연결물(ligate)는 *E. coli* DH5a에 형질전환되었다. 정확한 구조체를 가진 후보자들이 제한 효소 다이제스트에 의해 선택되었고, 클론의 DNA 서열을 분석하여 메티오닐 아미노펩티다아제를 가지고 있음이 확인되었다.

얻어진 플라스미드는 발현을 위해 *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL로 형질전환되었다. MetAP 유전자의 과량발현은 이소프로필-β-D-티오갈락토피라노사이드(IPTG)를 중간 기하급수적 성장기에 첨가하고, 37°C에서 3시간 동안 항온 배양함으로써 유도되었다. 세포는 원심분리(4°C에서 20분간 6,000 x g)를 통하여 얻어졌고, 0.1M KCl 및 10% 글리세롤을 포함하는 50mM 트리스-HCl 완충용액(pH 8.0)에서 재현탁시켰다. 세포는 초음파에 의해서 분쇄되어지고, 원심분리(4°C에서 30분간 20,000 x g)에 의해서 분리되었다. 얻어진 상등액은 TALON™ 금속 친화성 레진(BD Bioscience Clontech, 파우로 알토, 캘리포니아)의 컬럼에 처리되고, 0.5 M KCl 및 10% 글리세롤을 포함하는 50mM 트리스-HCl 완충용액(pH 8.0)안의 10mM 이미다졸(시그마, 세인트 루이스, 미주리)로 세척되었고, MetAP는 완충용액내의 300mM 이미다졸으로 용출되었다. 모아진 분획은, 다음으로 두 번 완충용액 교환을 통하여, 4°C에서 10% 글리세롤이 포함되어 있는 50mM 트리스-HCl(pH 8.0) 완충용액으로 완충용액교환이 되어졌다.

단백질 농도는 24,890 M⁻¹cm⁻¹의 몰 흡광 계수를 이용하여 280nm에서의 흡광도로부터 측정되었다. 단백질의 정제도는 표준 방법으로 수행되어진 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동(SDS-PAGE) 분석에 의해서 조사되었다.

(4) MetAP 유전자의 일차 구조 및 재조합 효소의 발현

최근에 본 발명의 발명자들은 고호열성 범위 (70-90°C)에서 생장하는 고호열성 고세균 *Thermococcus* sp. NA1를 분리하였고, *Thermococcus* sp. NA1의 게놈 서열을 분석함으로써 발린을 N-말단에 갖으며, 예측되는 분자량이 32,981 Da인 295 아미노산으로 구성되는 단백질을 암호화하는 888 bp로 구성되는 오픈 리딩 프레임을 발견하였다. 이것을 TNA1_MetAP라고 지정하였으며, *T. kodakarensis* KOD1 (85% 동일성) (Fukui et al., 2005), *P. abyssi* GE5 (72% 동일성) (Cohen et al., 2003), *P. horikoshii* OT3 (71% 동일성) (Kawarabayasi et al., 1998), 및 *P. furiosus* DSM 3638 (71% 동일성) (Robb et al., 2001) 으로 부터의 추정적 MetAP 유전자와 높은 유사성을 나타낸다(도 1).

추정된 아미노산 서열의 분석은, *E. coli* (Roderick and Matthews, 1993) 및 *P. furiosus* (Tahirov et al., 1998)의 MetAP 결정구조로부터 금속이온 조절에 관련된 활성 부위 잔기로서 원래 확인되어진, 두 개의 아스파틱 산 (Asp83, Asp94), 한 개의 히스티딘 (His154) 및 두 개의 글루탐산 (Glu188, Glu281)이 완벽하게 TNA1_MetAP 에서 보존되어 있다는 것을 보인다. 두 개의 양전하를 띤 잔기들, His63 및 His162 도 또한 보존되어 있었으며, 촉매작용에서 이들의 역할은 *E. coli* 아미노펩티다제 P 로부터 얻은 자료에 기초할 때 핵의 중심으로부터 용매로 양성자를 교환하는 것으로 보인다(Wilce et al., 1998).

본 발명의 단백질은 다음의 두 범주에서 *P. furiosus* MetAP에 유사한 IIa 유형 MetAP 도메인 구조인 것으로 나타났다 - i) C-말단 도메인내에 삽입된 추가의 62 아미노산 나선형 서브도메인 및 ii) 고세균 MetAP가 진화적으로 진행생물과 세균의 경계에 위치한다는 것을 제시하는, N-말단 확장부의 부재.

본 발명의 TNA1_MetAP 유전자는 PCR에 의하여 증폭되었고, 발현된 효소를 상기 방법 및 재료에 기재된 것처럼 용해가 가능한 세포 추출물로부터 정제하였다.

SDS/PAGE에 의한 분석은 33-kDa MetAP 단백질 및 단백질의 C-말단에서 VDKLAAALEH₆-(His-태그) 에 상응하는 1.7-kDa 펩타이드로 구성되는 융합물의 기대된 크기인 34-kDa의 단백질이 정제된 시료의 주요 구성성분이라는 것을 보여준다(도 2).

[실시예 2] 메티오닐 아미노펩티다제 효소의 생화학적 특성규명

(1) 효소 측정방법

MetAP의 활성은 Met-pNA (Bachem AG)의 가수분해를 측정하여 분석하였다.

50 mM 소듐 포스페이트 완충용액 (pH 7.0), 4 mM Met-pNA, 및 0.2 mM MnCl₂을 함유하는 분석 혼합물(800 μl)은 5 분동안 80 °C에서 항온보관 되었다. 반응은 본 발명의 효소의 첨가에 의하여 개시되었다. 상기 혼합물을 80 °C에서 5분간 더 항온반응되었으며, 반응은 1 M 트리클로로아세트산(100 μl)의 첨가로 중지되었다. 방출되는 p-니트로아닐린의 흡광도를 405 nm에서 측정하였다. 405nm에서 p-니트로아닐린의 몰 흡광 계수인 $\epsilon_{405\text{ nm}} = 10,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 을 사용하여 효소의 활성을 계산하였다. MetAP 활성의 1 단위는 상기 분석조건하에서 일분 당 1 μmol의 p-니트로아닐린을 방출하는 효소의 양으로 정의하였다.

(2) 효소의 생화학적 특성규명

본 발명의 정제된 재조합 단백질은 Met-pNA 의 가수분해에 의하여 MetAP 활성을 보여주었고 이 기질은 모든 반복되는 분석에서 사용되었다.

Met-pNA에 대한 MetAP 활성은 높은 온도에서 강하게 촉진되었고, 최적 온도는 80-90°C를 나타내으며, 30°C-50 °C에서는 최대활성의 12% 이하였다(도 3). MetAP 활성에 대한 pH영향을 pH범위 4-10의 다양한 완충용액을 사용하여 측정하였고 최적활성을 pH 7.0에서 관찰하였다(도 3).

TNA1_MetAP의 열에 대한 안정성은 본 효소를 0.2 mM CoCl₂를 함유한 50 mM 소듐 포스페이트 완충용액 (pH 7.0) 내에서 80°C 및 90°C로 항온반응함으로써 측정하였다. 놀랍게도, TNA1_MetAP는 80°C 및 90°C에서 5분내에 효소활성을 완전히 상실하였다(도 4). 고호열성 고세균으로부터의 대부분의 효소들이 일반적으로 높은 열안정성을 보여주고 있기 때문에 이러한 결과는 매우 특이한 것이다. 이와는 대조적으로, *P. furiosus* MetAP는 높은 열안정성을 보여준다(90°C, pH 7.5에서 4.5시간의 반감기) (Tsunasawa et al., 1997).

도 1에 보인바와 같이, TNA1_MetAP 의 추정된 아미노산 서열과 *P. furiosus* MetAP 와의 비교는 TNA1_MetAP가 단하나의 시스테인 잔기(Cys53)를 가지는 반면, *P. furiosus* MetAP에서는 시스테인 잔기가 전혀 없었다는 것을 보인다. 높은 온도에서(Larrabee et al., 1999) 또는 정제과정에서(Chang et al., 1990) MetAP의 불안정성은 시스테인 잔기의 산화에 기인하는 것으로 보고되고 있다. TNA1_MetAP의 시스테인 잔기가 열안정성에서 핵심 조절자인지 아닌지 실험하기 위하여, 본 단백질을, 온화한 산화제로서 시스테인 티올을 설페닉산으로 바꾸는 p-하이드록시머큐리벤조에이트를 처리하였다. 밀리몰 범위의 p-하이드록시머큐리벤조에이트가 0.2 μM 의 TNA1_MetAP를 완전히 저해하였는데, 이것은 TNA1_MetAP 및 *P. furiosus* MetAP 간에 측정된 열안정성의 차이가 산화에 민감한 시스테인 잔기에 기초한 것이라는 것을 암시한다.

금속 결합을 위한 보존된 아미노산 잔기는 TNA1_MetAP가 금속이온의 첨가에 의하여 영향을 받을 수 있다는 것을 암시한다. TNA1_MetAP의 금속이온 요구도를 실험하기 위하여 내부적인 금속이온을 금속이 없는 Tris-HCl 완충용액에 대한 투석에 의하여 제거하였다.

금속이 없는 MetAP를 0.2 mM MnCl₂, NiCl₂, CoCl₂ 및 FeSO₄ 와 함께 항온반응한 후에 MetAP 의 효소 활성이 각각 28, 5, 4 및 3배 증가하였다. BaCl₂, CaCl₂, CuCl₂, MgCl₂, 및 ZnCl₂ 과 함께 항온반응한 경우에는 활성이 거의 또는 전혀 촉진되지 않았다. MetAP 의 활성에 대한 Mn²⁺, Ni²⁺, Co²⁺ 및 Fe²⁺ 농도의 효과는 도 5에 나타나 있다. TNA1_MetAP 는 CoCl₂ 및 FeSO₄에 대한 값이 MnCl₂의 것보다 10%미만이라는 하였으나, 0.2-0.3 mM MnCl₂ 및 CoCl₂, 그리고 0.5-0.8 mM NiCl₂ 및 FeSO₄의 농도에서 최대활성을 나타내었다.

Co²⁺ (Meng et al., 2002; Tsunasaawa et al., 1997), Mn²⁺ (D'souza et al., 2002) 및 Fe²⁺ (Copik et al., 2005; Meng et al., 2002)의 첨가에 따라서 *P. furiosus* MetAP 가 활성화되는 것이 알려져 있다. 반응속도분석은 Met-pNA 을 사용하여 수행되었고, K_m (0.68 mM), V_{max} (4.8 μmol min⁻¹ mg⁻¹) 및 k_{cat} (168 s⁻¹) 같은 반응속도 상수는 측정된 활성으로부터 계산하였다(도 6).

(5) 특성비교분석

TNA1_MetAP는 *E. coli*에서 유전자의 과량발현 및 클로닝에 의하여 확인되어진 *P. furiosus* DSM 3638로부터 MetAP에 84%의 유사도 및 71%의 동일성을 보였다(Tsunasawa et al., 1997). *Thermococcus* 속에서 기능성이 있다는 것의 발견은 이들 효소활성이 Thermococaceae의 패밀리 및 그 이상에서 일반적으로 존재할 것이라는 것을 가르키고, *P. furiosus* 및 TNA1_MetAP 사이의 C-말단의 삽입 및 N-말단 확장부의 부존재의 보존은 고호열성 고세균 MetAP가 진화적으로 진핵생물-세균 경계에 있다는 것을 제시한다.

아미노산 서열에서 높은 상동성(84%), 중요한 도메인 구조의 보존, 비슷한 최적 온도 및 pH에도 불구하고, *P. furiosus* MetAP가 열에 안정한 반면에, TNA_MetAP가 열에 불안정하다는 점은 흥미롭다. TNA1_MetAP의 열 안정성은 상승된 온도에서 빠르게 활성을 잃어버리는 *E. coli* MetAP와 비교할 만하다. *S. cerevisiae*에서 분리되어진 MetAP 유형 I은 분리과정 동안 및 머큐릭 콜로이드 및 설프하이드릴-변형제인 p-하이드록시머큐리벤조산의 처리에 의해서 불활성화되어질 수 있고, 이것은 촉매 잔기 또는 활성부위 금속 이온 결합하기 위한 배위 결합 자리에 있는 설프하이드릴기가 MetAP의 안정성에 중요한 역할을 한다는 것을 제시한다. 라라비(Larrabee) 등은 시스테인 잔기를 DTNB(5,5'-디티오비스(2-니트로벤조산)) 및 TCEP-HCl (트리스(2-카르복시에틸)-포스핀 하이드로클로라이드)으로 처리한 실험에 의해서 7개의 시스테인 잔기 중에 하나 이상의 산화가(아마도 Cys59 및 Cys70) *E. coli* MetAP를 불활성화시킨다고 제안했다. *E. coli* MetAP의 결정학적 연구에서 소수성 기질 결합 포켓이 Cys59, Cys70, Tyr62, Tyr65, Phe177 및 Trp221에 의하여 만들어진다는 것을 보였다(Lowther et al., 1999). 아미노산 서열을 비교해보면, 효모 MetAP의 Cys193은 *E. coli* MetAP안의 Cys70과 배열되었다(Tahirov et al. 1998; Tsunasawa et al., 1997). TNA1_MetAP의 경우에, 전체 분자에서 단 하나의 시스테인 잔기(Cys53)가 있었고, TNA1_MetAP가 p-하이드록시머큐리벤조산에 의해 불활성화 된다는 결과는 시스테인 잔기가 TNA1_MetAP의 안정성 조절에 관여한다는 것을 제시한다. 더욱더, *P. furiosus* MetAP는 매우 열안정적이고(Tsunasawa et al., 1997), 전체 분자에 시스테인 잔기를 가지고 있지 않다는 것을 주목할 필요가 있다. 돼지의 간에서 분리된 포유류 MetAP는 4°C에서 몇 개월동안 전체 활성이 유지되었다고 보고되고, 이것 또한 시스테인 잔기를 가지고 있지 않았다(Kendall and Bradshaw 1992). 그러나, TNA1_MetAP안에 있는 Cys53은 하나의 아미노산 차이에 의해서 아미노산 서열 어라인먼트에서 *E. coli*의 Cys70과 정확하게 맞지는 않았다(Tahirov et al., 1998; Tsunasawa et al., 1997).

지금까지 조사되어진 모든 형태의 MetAP는 메탈로단백질인 것으로 보이고, Mn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} 및 Zn^{2+} 같은 금속이온에 의해 활성화 되거나, 감수성이었다. 활성도는 *E. coli* MetAP에 대하여 Co^{2+} , Mn^{2+} , 및 Zn^{2+} (BenBassat et al., 1987; Larrabee et al., 1999; Lowther et al., 1999); 효모의 MetAP 유형 1b에 대하여 Co^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} 및 Ni^{2+} (Walker 및 Bradshaw, 1998); 효모의 MetAP 유형 IIb에 대하여 Co^{2+} (chang et al., 1992); *P. furiosus* MetAP에 대하여 Co^{2+} , Mn^{2+} 및 Fe^{2+} (D'souza et al., 2002); 인간의 MetAP 유형 IIb에 대하여 Co^{2+} 및 Mn^{2+} (Li 및 Chang, 1996)를 포함하여 다른 2가 이온의 존재에서 관찰되었다. 본 발명에 따른 TNA1_MetAP는 Mn^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} 및 Co^{2+} 에 의존한다.

기질로 Met-pNA를 사용한 동력학적 분석에 의하여 동력학적 인자는 상기 기질이 TNA1_MetAP의 좋은 기질이었고, *E. coli* MetAP는 트라이펩타이드(tripeptide) 또는 보다 큰 기질에 대하여만 활성이 있었다. Met-pNA에 대한 TNA1_MetAP은 인간의 MetAP($K_m=0.67mM$)의 것과 비슷한 미켈리스(Michaelis) 상수를 보였으나, 인간의 MetAP($K_{cat} = 9.5 \text{ min}^{-1}$)의 것보다 상당히 높은 전환속도(turn over rate)을 보였다(Yang et al., 2001). 문헌에서, 비록 테트라펩타이드에 대한 이들의 MetAP의 K_m 값은 8.5, 3.16 및 0.34 mM (Copik et al., 2003; Meng et al. 2002; Yang et al., 2001)이었지만, *P. furiosus* MetAP가 테트라펩타이드 기질, Met-Gly-Met-Met에 대하여 *E. coli*($K_{cat}=2340 \text{ min}^{-1}$) 및 사람($K_{cat}=170 \text{ min}^{-1}$)의 것보다 높은 전환속도($K_{cat} 27,600 \text{ min}^{-1}$)를 보였다. 때문에, 고호열성 고세균으로부터의 TNA1_MetAP 및 *P. furiosus* MetAP가 인간의 MetAP 보다 높은 촉매적 전환속도를 보이고 있다. 구조적 정보 및 아미노산 서열의 어라인먼트는 인간의 MetAP 유형 IIb (Liu et al., 1998) 및 *P. furiosus* MetAP(Tahirov et al., 1998)는 '피타브레드(pitabread)' 접힘을 가지고 있다. 이것은 시트의 오목한 면의 대략적인 중심에 위치한 활성부위를 가진 중심의 β -병풍 구조를 가지고 있다. 인간의 MetAP 유형 IIb와 고세균 MetAP 사이의 구조상의 전체적인 유사성에도 불구하고, 인간의 MetAP 유형 IIb의 β_4 및 β_5 (잔기 312에서 319)안에 작은 삽입물 및 소수성 S1 사이트를 형성하는 잔기 같은 약간의 차이가 발견된다. 반면에, *P. furiosus* MetAP의 S1 사이트를 형성하는 7 잔기중에 4개 (Pro51, Leu60, Met207, 및 Tyr265)는 인간의 MetAP유형 IIb (Pro220, Ile338, Met384 및 Tyr444)에 동일하거나 보존되어져 있고, 인간의 MetAP의 Gly222 잔기는, *P. furiosus* MetAP안에 있는 Phe50과 정렬되는 Phe219 대신에 기질의 인식에 관여할 것으로 보인다.

발명의 효과

본 발명에 따른 단백질 분해 효소는 고호열성인 신규한 단백질 분해효소들이다.

메티오닐 아미노펩티다제는 원핵생물 및 진핵생물 모두에서 발견되는 도처에 존재하는 효소이며, 기능 조절, 세포내 타겟팅 및 단백질 재편성에 관계된 N-말단 변형을 위한 중요한 효소이다.

참고문헌

1. Afrin SM, Kendall RL, Hall L, Weaver LH, Stewart AE, Matthews BW, Bradshaw RA (1995) Eukaryotic methionyl aminopeptidases: two classes of cobalt-dependent enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 7714-7718
2. Ben-Bassat A, Bauer K, Chang SY, Myambo K, Boosman A, Chang S (1987) Processing of the initiation methionine from proteins: properties of the *Escherichia coli* methionine aminopeptidase and its gene structure. *J Bacteriol* 169, 751-757
3. Bradshaw RA, Brickey WW, Walker KW (1998) N-terminal processing: the methionine aminopeptidase and N alpha-acetyl transferase families. *Trends Biochem Sci* 23, 263-267
4. Chang YH, Teichert U, Smith JA (1990) Purification and characterization of a methionine aminopeptidase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 265, 19892-19897
5. Chang YH, Teichert Y, Smith JA (1992) Molecular cloning, sequencing, deletion, and overexpression of a methionine aminopeptidase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 267, 8007-8011
6. Cohen GN, Barbe V, Flament D, Galperin M, Heilig R, Lecompte O, Poch O, Prieur D, Querellou J, Ripp R, Thierry JC, Van der Oost J, Weissenbach J, Zivanovic Y, Forterre P (2003) An integrated analysis of the genome of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Mol Microbiol* 47, 1495-1512
7. Copik AJ, Swierczek SI, Lowther WT, D'Souza VM, Matthews BW, Holz RC (2003) Kinetic and spectroscopic characterization of the H178A methionyl aminopeptidase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 42, 6283-6292
8. Copik AJ, Waterson S, Swierczek SI, Bennett B, Holz RC (2005) Both nucleophile and substrate bind to the catalytic Fe(II)-center in the type-II methionyl aminopeptidase from *Pyrococcus furiosus*. *Inorg Chem* 44, 1160-1162
9. D'souza VM, Swierczek SI, Cospers NJ, Meng L, Ruebush S, Copik AJ, Scott RA, Holz RC (2002) Kinetic and structural characterization of manganese(II)-loaded methionyl aminopeptidases. *Biochemistry* 41, 13096-13105
10. Fukui T, Atomi H, Kanai T, Matsumi R, Fujiwara S, Imanaka T (2005) Complete genome sequence of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 and comparison with *Pyrococcus* genomes. *Genome Res* 15, 352-363
11. Kawarabayasi Y, Sawada M, Horikawa H, Haikawa Y, Hino Y, Yamamoto S, Sekine M, Baba S, Kosugi H, Hosoyama A, Nagai Y, Sakai M, Ogura K, Otsuka R, Nakazawa H, Takamiya M, Ohfuku Y, Funahashi T, Tanaka T, Kudoh Y, Yamazaki J, Kushida N, Oguchi A, Aoki K, Kikuchi H (1998) Complete sequence and gene organization of the genome of a hyper-thermophilic archaebacterium, *Pyrococcus horikoshii* OT3. *DNA Res* 30, 55-76
12. Kendall RL, Bradshaw RA (1992) Isolation and characterization of the methionine aminopeptidase from porcine liver responsible for the co-translational processing of proteins. *J Biol Chem* 267, 20667-20673

13. Larrabee JA, Thamrong-nawasawat T, Mon SY (1999) High-pressure liquid chromatographic method for the assay of methionine aminopeptidase activity: application to the study of enzymatic inactivation. *Anal Biochem* 269, 194-198
14. Li X, Chang YH (1996) Evidence that the human homologue of a rat initiation factor-2 associated protein (p67) is a methionine aminopeptidase. *Biochem Biophys Res Commun* 227, 152-159
15. Liu S, Widom J, Kemp CW, Crews CM, Clardy J (1998) Structure of the human methionine aminopeptidase-2 complexed with fumagillin. *Science* 282, 1324-1327
16. Lowther WT, Matthews, BW (2000) Structure and function of the methionine aminopeptidases. *Biochim Biophys Acta* 1477, 157-167
17. Lowther WT, Orville AM, Madden DT, Lim S, Rich DH, Matthews BW (1999) *Escherichia coli* Methionine Aminopeptidase: Implications of crystallographic analyses of the native, mutant, and inhibited enzymes for the mechanism of catalysis. *Biochemistry* 38, 7678-7688
18. Meng L, Ruebush S, D'souza VM, Copik AJ, Tsunasawa S, Holz RC (2002) Overexpression and divalent metal binding properties of the methionyl aminopeptidase from *Pyrococcus furiosus*. *Biochemistry* 41, 7199-7208
19. Oefner C, Douangamath A, D'Arcy A, Hafeli S, Mareque D, MacSweeney A, Padilla J, Pierau S, Schulz H, Thormann M, Wadman S, Dale GE (2003) Structure of the *Staphylococcus aureus* methionyl-aminopeptidase and complexes with triazole-based inhibitors, *J Mol Biol* 332, 13-21
20. Prchal JT, Cashman DP, Kan YW (1986) Hemoglobin Long Island is caused by a single mutation (adenine to cytosine) resulting in a failure to cleave amino-terminal methionine. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 24-27
21. Robb FT, Maeder DL, Brown JR, DiRuggiero J, Stump MD, Yeh RK, Weiss RB, Dunn DM (2001) Genomic sequence of hyperthermophile, *Pyrococcus furiosus*: implications for physiology and enzymology. *Methods Enzymol* 330, 134-157
22. Roderick SL, Matthews BW (1993) Structure of the cobalt-dependent methionine aminopeptidase from *Escherichia coli*: a new type of proteolytic enzyme. *Biochemistry* 32, 3907-3912
23. Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
24. Tahirov TH, Oki H, Tsukihara T, Ogasahara K, Yutani K, Ogata K, Izu Y, Tsunasawa S, Kato I (1998) Crystal structure of methionine aminopeptidase from hyperthermophile, *Pyrococcus furiosus*. *J Mol Biol* 284, 101-124
25. Tsunasawa S, Izu Y, Miyagi M, Kato I (1997) Methionine aminopeptidase from the hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*: molecular cloning and overexpression in *Escherichia coli* of the gene, and characteristics of the enzyme. *J Biochem (Tokyo)* 122, 843-850
26. Varshavsky A (1997) The N-end rule pathway of protein degradation. *Genes Cells* 2:13-28
27. Walker KW, Bradshaw RA (1998) Yeast methionine aminopeptidase I can utilize either Zn²⁺ or Co²⁺ as a cofactor: a case of mistaken identity? *Protein Sci* 7, 2684-2687
28. Wilce MC, Bond CS, Dixon NE, Freeman HC, Guss JM, Lilley PE, Wilce JA (1998) Structure and mechanism of a proline-specific aminopeptidase from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 3472-3477

29. Yang G, Kirkpatrick RB, Ho T, Zhang GF, Liang PH, Johanson KO, Casper DJ, Doyle ML, Marino JP Jr., Thompson SK, Chen W, Tew DG, Meek TD (2001) Steady-state kinetic characterization of substrates and metal-ion specificities of the full-length and N-terminally truncated recombinant human methionine aminopeptidases (type 2). *Biochemistry* 40, 10645-10654

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명에 따른 *Thermococcus* sp. NA1으로부터 메티오닐아미노펩티다아제(이하 TNA1_MetAP라 부름), *T. kodakarensis* KOD1(tkKOD1, YP_183596), *P. abyssi* GE5(PaGE5, NP_127098), *P. horikoshii* OT3(PhoT3, NP_142587), 및 *P. furiosus* DSM3638(PfDSM, NP_578270)의 서열비교를 나타낸다. - 는 공백을 나타내며, 오른쪽의 숫자는 원래의 서열에서 마지막 잔기의 위치를 나타낸다. 도면의 네 효소간에 동일한 잔기는 별표(*)로 표시하였고 보존적 치환 및 반-보존적 치환은 두 점(:) 및 하나의 점(.)으로 각각 표시하였다. 금속이온 배위 결합 및 양성자 교환에 참여하는 추정적인 활성 잔기를 굵게 나타냈었고, 기질 인식에 관여하는 포켓을 구성하는 잔기는 이탤릭으로 나타내었다.

도 2는 정제된 TNA1_MetAP 효소의 SDS-PAGE (12%)의 결과를 나타낸다. M 레인의 분자량 스탠다드는 포스포릴라제 b(phosphorylase b; 103 kDa), 소 혈청 알부민(bovine serum albumin; 77 kDa), 오발부민(ovalbumin; 50 kDa), 카보닉 안하이드라제(carbonic anhydrase; 34.3 kDa), 콩 트립신 억제제(soybean trypsin inhibitor; 28.8 kDa) 및 리소자임(lysozyme; 20.7 kDa) 이다. 본 발명의 효소에 상응하는 밴드는 화살표로 표시하였다.

도 3은 TNA1_MetAP의 활성에 대한 온도(A) 및 pH(B)의 효과를 나타낸다. A: 시료온도를 30에서 100°C 까지 증가시키며, 표준상태에서 활성분석을 수행하였다. B, 소듐 아세트산 (원), pH 4-6; 소듐 포스페이트(사각형), pH 4.0-6.0; 트리스-HCl(삼각형) PH 8.0-10.0의 완충용액(각각 50Mm)을 사용하였고 Met-pNA의 가수분해를 이용하여 표준상태에서 활성분석을 실시하였다.

도 4는 TNA1_MetAP 의 열에 의한 불활성화를 나타낸다. TNA1_MetAP를 0.2 mM MnCl₂를 함유하는 50 mM 소듐 아세트산 완충용액, pH 7.0에서 80°C (○) 또는 90° (●)에서 배양하였다. 도면에 나타낸 시간에서, 일정분량의 시료를 채취하였고, 그 활성을 Met-pNA를 기질로 사용하여 80°C에서 동일한 완충용액 내에서 측정하였다.

도 5는 TNA1_MetAP 의 활성에 대한 금속이온의 효과를 나타낸다. 활성분석은 표준 조건하에서 수행하였으나, 2가 금속이온의 농도는 다양하다: Co²⁺ (▲), Mn²⁺ (●), Ni²⁺ (◆) 및 Fe²⁺ (■)

도 6은 TNA1_MetAP 활성에 대한 증가하는 기질 농도의 효과를 나타낸다. 활성분석은 표준조건하에서 실시되었으나 Met-pNA의 농도는 다양하다.

도 7은 본 발명에 따른 재조합 메티오닐아미노펩티다아제 효소를 가지고 있는 재조합플라스미드의 개열지도를 보인다.

도면

도면1

```

TNA1      VDREALIKAGEIARQVKKEVISLIKPGTKLYDIAEFVERRIIELGKPAFFPCNLSINEI 60
TkKOD1    MDEREALIKAGEIARQVKKEVVDLIKPGAKLYDIAEFVERRIVELGGKPAFFPCNLSINEI 60
PaGE5     -MDVDKLI EAGKIAKKVREEAVKLAKPGVSLLELAEKIEGRIIELGAKPAFFVNLSLNEI 59
PhOT3     -MDVDKLI EAGKIAKKVREEAVKLAKPGVSLLELAEKIESRIVELGGKPAFFPANLSLNEV 59
PfDMS     -MDTEKLMKAGEIAKKVREKAIKLARPGMLLLELAESIEKMIMELGGKPAFFVNLSINEI 59
          : : *::**::**::*:::..:..* :** * ::** :* *::***.***** **::**::

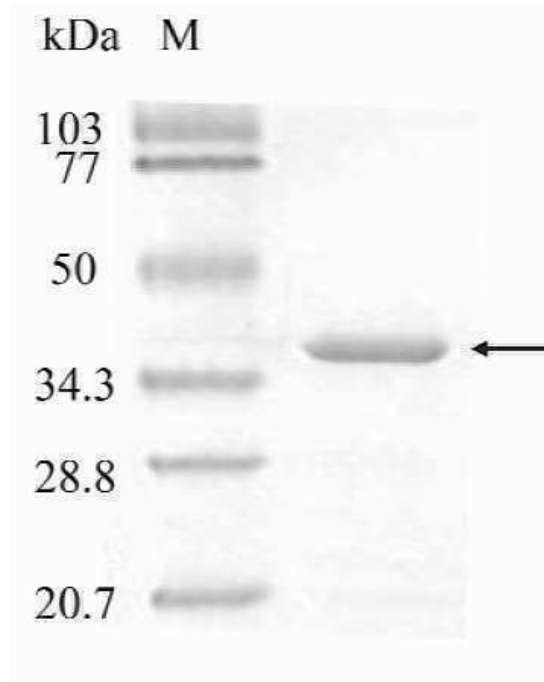
TNA1      AAHYTPYKGD ETVLKEGDYLVKVDIGVHVDGYIADTALTFRVGMEEDDLVTAAREALENAI 120
TkKOD1    AAHYTPYKGD ETVLKEGDYLVKLDIGVHVDGYIADTAVTFRVGMEEDDELMEAAAREALENAI 120
PaGE5     AAHYTPYKGD ETVLKEGDYLVKIDIGVHIDGYIADTAVTVRVGMEEDDLMEAAAREALESAI 119
PhOT3     AAHYTPYKGD QTVLKEGDYLVKIDLVGHIDGYIADTAVTVRVGMDFDELMEAAAKEALESAI 119
PfDMS     AAHYTPYKGD TTVLKEGDYLVKIDVGVHIDGFIADTAVTVRVGMEEDDELMEAAKEALNAAI 119
          ***** * .*****:*.***:*.***:*.***:*.***: *.*: **::**:: **

TNA1      KVIRAGIKINEIGKAI EETIRGYGFNP I VNLSG HKIERYK L HAGISIPNIYR PADSYVLK 180
TkKOD1    ATVIRAGVMIRDVARAIE EETIRGKGFNP I VNLSG HKVERYK L HAGSVPNVYREADTYVLQ 180
PaGE5     SVARAGVEIKELGRAIE DEIRKRGFNP I VNLSG HKIERYK L HAGISIPNIYRPHDNYKLR 179
PhOT3     SVARAGVEVKELGKAIENEIRKRGFNP I VNLSG HKIERYK L HAGVSI PN IYRPHDNYVLQ 179
PfDMS     SVARAGVEIKELGKAIENEIRKRGFKP I VNLSG HKIERYK L HAGISIPNIYRPHDNYVLK 179
          . ***: :.:::***: * **::*****:*****:***:** *.* **

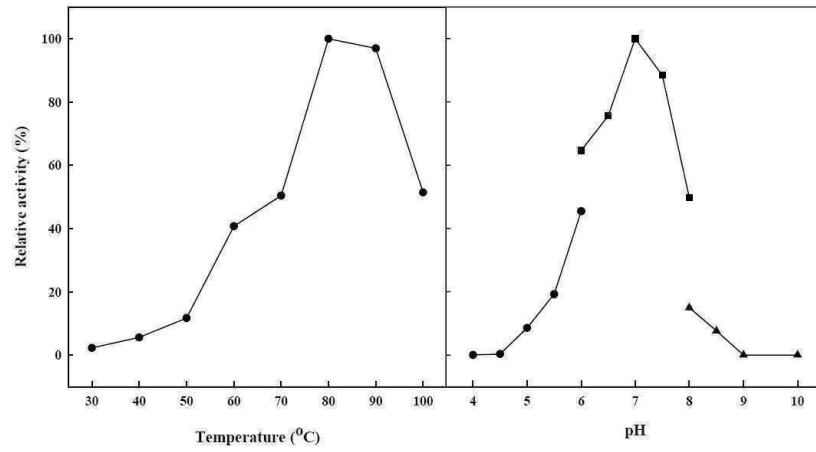
TNA1      EGDVFAIE PFATTGAGQVIEVPPALIFMYLRDRPVRMAQARRVLMHIKREYNGLPFAYRW 240
TkKOD1    EGDVFAIE PFATTGAGQVIEVPPALIFMYLRDRPVRMLQARRLLMHIKKNYKTLPFAYRW 240
PaGE5     EGDVFAIE PFATTGAGQVIEVPPPTLYMYVRDAPVRMQARFLLAKIKREYKTLPFAYRW 239
PhOT3     EGDVFAIE PFATTGAGQVIEVPPPTLYMYVRDAPVRMAQARFLLAKIKREYKTLPFAYRW 239
PfDMS     EGDVFAIE PFATIGAGQVIEVPPPTLYMYVRDVPVRVAQARFLLAKIKREYKTLPFAYRW 239
          ***** *****:***:** **:: ** * :**::* *****

TNA1      LQGFMEGQLKLALAQ LDRVGA IYSYPI LREVRGGLVAQFEHTVIVEKEGAYITT- 295
TkKOD1    LQDFLEPGQLKLALAQLEKAGAIYAYPI LREVRGGMVAQFEHTVIVEKEGAYITT- 295
PaGE5     LQGFMEGQLKLALRTLEKSGALYGYVPLREIRNGLVTQFEHTIIVEKDSVIVTTE 295
PhOT3     LQGFMEGQLKLALRSLSRSGALYGYVPLREIRGGMVTFEHTIIVEKDSVIVTTE 295
PfDMS     LQNDMPEGQLKLALKTLEKAGAIYGYVPLKEIRNGIVAQFEHTIIVEKDSVIVTTE 295
          ** .***** *:: **::**::**::**::**::**::**::**::**::**::**::**
    
```

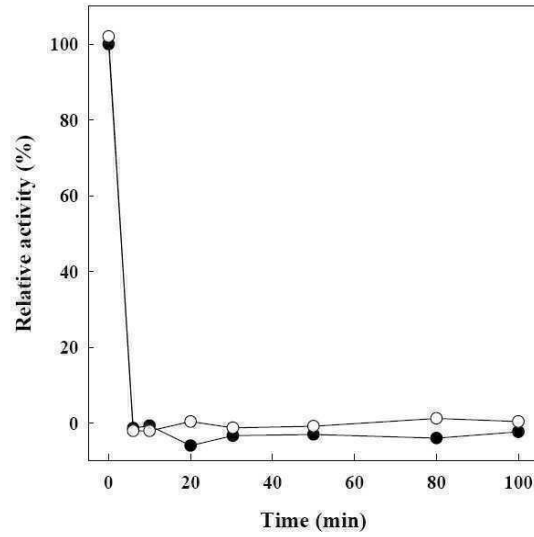
도면2



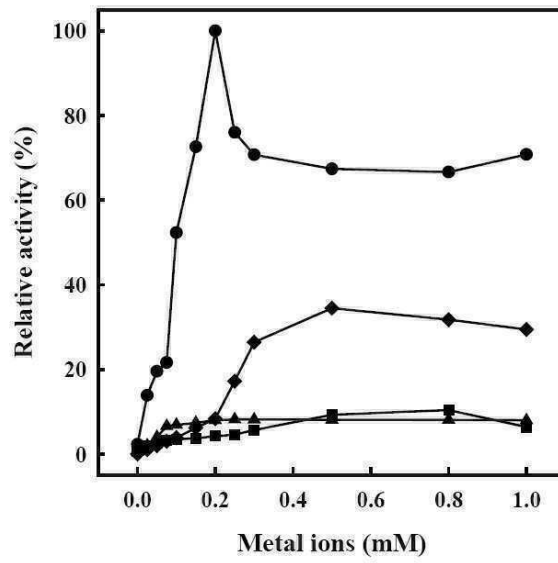
도면3



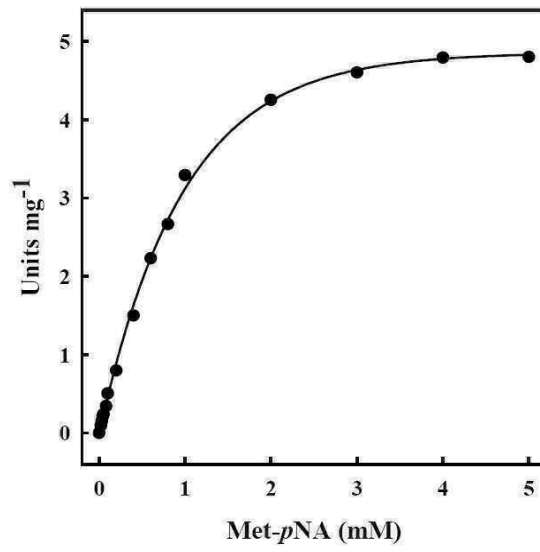
도면4



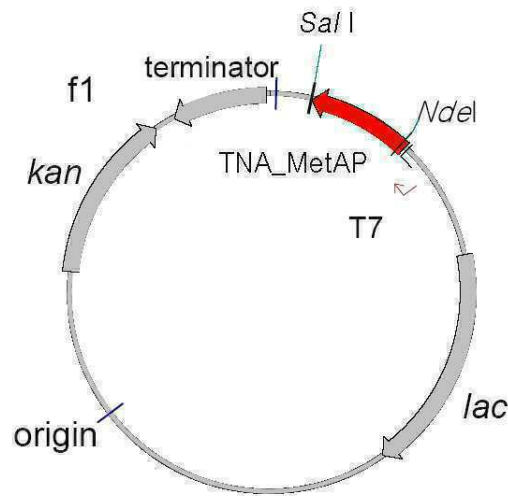
도면5



도면6



도면7



서열목록

<110> KOREA OCEAN RESEARCH AND DEVELOPMENT INSTITUTE

<120> Hyperthermophilic Methionylaminopeptidase and Methods of Preparation Thereof

<160> 4

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 888

<212> DNA

<213> Thermococcus sp.

<400> 1

gtggatgaaa gggaggccct cataaaagct ggggagatag ccagacaggt taagaaagaa	60
gtaattagcc taataaaagcc agggacaaag ctttatgata tagccgagtt cgtggagaga	120
agaataatcg agctcggcgg aaagcctgcc tttccgtgca acctttcgat aaacgagata	180
gcggcacact acacgcccta caagggcgac gagaccgttc taaaggaggg cgactaccta	240
aaggttgaca ttggggttca cgttgatggt tatatagccg acaccgccct gaccttccgg	300
gtcggaatgg aagaggacga cctagtgacg gctgcgagag aggctctcga gaacgctata	360
aaagtcatcc gcgccggaat caagataaac gagattgaa aggccataga agaaaccatt	420
agaggatacg gcttcaaccc gatagtgaac ctcagcggtc acaagataga gaggtataaa	480

ctccacgccg gcatctcaat cccaacatc taccgtccag cggacagcta cgtgctgaag 540
 gagggtgacg tgatagcaat agaacccttc gccacaactg gggcaggaca ggtcattgag 600
 gttccaccgg cactgatttt tatgtatctc agagacaggc cagtgaggat ggcccaggca 660
 agaagagtgc ttatgcacat aaagagggag tacaacggcc ttcccttcgc ataccggtgg 720
 ctccaggggt ttatgcccga aggccagctt aagctagccc tagcccagct cgatagagtg 780
 ggggcgatat acagctaccc gatactgagg gaagtccgcg gcggtctcgt tgctcagttc 840
 gagcacactg ttatagtcga gaaggagggg gcttacataa ccacctaa 888

<210> 2
 <211> 295
 <212> PRT
 <213> Thermococcus sp.

<400> 2
 Val Asp Glu Arg Glu Ala Leu Ile Lys Ala Gly Glu Ile Ala Arg Gln
 1 5 10 15
 Val Lys Lys Glu Val Ile Ser Leu Ile Lys Pro Gly Thr Lys Leu Tyr
 20 25 30
 Asp Ile Ala Glu Phe Val Glu Arg Arg Ile Ile Glu Leu Gly Gly Lys
 35 40 45
 Pro Ala Phe Pro Cys Asn Leu Ser Ile Asn Glu Ile Ala Ala His Tyr
 50 55 60
 Thr Pro Tyr Lys Gly Asp Glu Thr Val Leu Lys Glu Gly Asp Tyr Leu
 65 70 75 80
 Lys Val Asp Ile Gly Val His Val Asp Gly Tyr Ile Ala Asp Thr Ala
 85 90 95
 Leu Thr Phe Arg Val Gly Met Glu Glu Asp Asp Leu Val Thr Ala Ala
 100 105 110
 Arg Glu Ala Leu Glu Asn Ala Ile Lys Val Ile Arg Ala Gly Ile Lys
 115 120 125
 Ile Asn Glu Ile Gly Lys Ala Ile Glu Glu Thr Ile Arg Gly Tyr Gly
 130 135 140
 Phe Asn Pro Ile Val Asn Leu Ser Gly His Lys Ile Glu Arg Tyr Lys
 145 150 155 160
 Leu His Ala Gly Ile Ser Ile Pro Asn Ile Tyr Arg Pro Ala Asp Ser

	165		170		175
Tyr Val Leu Lys Glu Gly Asp Val Ile Ala Ile Glu Pro Phe Ala Thr					
	180		185		190
Thr Gly Ala Gly Gln Val Ile Glu Val Pro Pro Ala Leu Ile Phe Met					
	195		200		205
Tyr Leu Arg Asp Arg Pro Val Arg Met Ala Gln Ala Arg Arg Val Leu					
	210		215		220
Met His Ile Lys Arg Glu Tyr Asn Gly Leu Pro Phe Ala Tyr Arg Trp					
	225		230		235
Leu Gln Gly Phe Met Pro Glu Gly Gln Leu Lys Leu Ala Leu Ala Gln					
	245		250		255
Leu Asp Arg Val Gly Ala Ile Tyr Ser Tyr Pro Ile Leu Arg Glu Val					
	260		265		270
Arg Gly Gly Leu Val Ala Gln Phe Glu His Thr Val Ile Val Glu Lys					
	275		280		285
Glu Gly Ala Tyr Ile Thr Thr					
	290		295		

<210> 3
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Methionyl aminopeptidase sense primer

<400> 3
 cgacccggca tatggatgaa agggaggccc tcataaaag 39

<210> 4
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Methionyl aminopeptidase antisens primer

<400> 4
 ctccacatgt cgacggtggt tatgtaagcc ccctccttc 39