



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.

C12N 15/52 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 9/48 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0046637
(43) 공개일자 2007년05월03일

(21) 출원번호 10-2005-0103489
(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
 이문섭
 양부현

전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 고희열성 카르복시펩티다아제 효소 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 고호열성 카르복시펩티다아제 효소 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, *Thermococcus* sp. 균주(KCTC 10859BP)로부터 분리되어진 신규의 고호열성 카르복시펩티다아제 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 카르복시펩티다아제 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 카르복시펩티다아제 효소를 암호화하는 핵산서열.

청구항 6.

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

청구항 7.

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

청구항 8.

제 1 항에 따른 고호열성 카르복시펩티다아제 효소가 서열번호 2를 가지는 것을 특징으로 하는 카르복시펩티다아제 효소.

청구항 9.

제 1 항에 따른 고히열성 카르복시펩티다아제 효소가 서열번호 2와 기능적으로 동등한 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 카르복시펩티다아제 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 카르복시펩티다아제 효소를 분리하는 것을 특징으로 하는 고히열성 카르복시펩티다아제 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.

카르복시펩티다아제 (CP)소개

카르복시펩티다아제 (CP)는 폴리펩타이드의 C-말단에 작용하여 단일의 아미노산 또는 다이펩타이드(dipeptide)을 만든다. 카르복시펩티다아제는 세 개의 카테고리로 나눌 수 있다. 상기 효소의 활성 부위에서 아미노산 잔기의 성질에 기초하여 세린 카르복시펩티다아제, 메탈로카르복시펩티다아제, 및 시스테인 카르복시펩티다아제이다.

메탈로카르복시펩티다아제는 그들의 활성화에 2개의 금속 이온이 요구되는 것이 특징이다. 펩티다아제 패밀리에 속하는 열안정성 카르복시펩티다아제 I (EC 3.4.17.19)는 HEXXH 금속 결합 모티프를 포함하고 있어 다른 메탈로펩티다아제와는 구별된다. 여러 개의 열안정적 카르복시펩티다아제 I 유전자는 모든 세 생물계 즉 고세균, 세균 및 진핵생물에 걸쳐 나타난다. 이들 중에, *Thermus aquaticus*(카르복시펩티다아제 Taq), *T. thermophilus* 및 고히열성 고세균 *Pyrococcus furiosus*으로부터 단 세 개의 열안정적 카르복시펩티다아제가 분리되어졌고, 특성이 연구되었다. 열안정적 카르복시펩티

아제 I은 최적온도가 80-100°C여서 매우 열안정적인 것으로 알려졌다. 활성화에 대한 높은 최적 온도는 각각 최적온도가 60 및 85°C로서, 세균 *Thermoactinomyces vulgaris* 및 고세균 *Sulfolobus solfataricus*로부터 분리되어진 다른 카르복시펩티다아제들에게서 보고되었다.

열안정적 카르복시펩티다아제 I은 넓은 기질 특이성을 보인다. 예를 들어, *P. furiosus* 카르복시펩티다아제는 C-말단에 Gly, Pro 또는 산성 잔기(Asp 및 Glu)을 가지는 펩타이드는 분해를 못하지만, C-말단의 염기성, 방향족성, 중성 및 극성 아미노산은 분해를 한다. 카르복시펩티다아제 Taq의 경우에는 Pro를 제외하고, C-말단의 중성, 염기성, 및 산성 아미노산을 분해하며, 긴 사이드 체인을 가진 아미노산을 가장 빠르게 분해한다.

미생물의 메탈로카르복시펩티다아제의 생리적 역할은 아직 정해지지 않았다. 포유류의 메탈로카르복시펩티다아제는 카르복시펩티다아제 A 및 B에 의한 소화적인 단백질 분해에서 카르복시펩티다아제 N 및 엔케팔린 컨버타아제에 의한 생물학적 활성 펩타이드의 성숙과 같은 특정한 단백질분해 과정에 이르기까지 다양한 생물학적 과정에서 중요한 역할을 한다. 한편 합성 또는 자연의 펩타이드 기질에 대한 *P. furiosus* 카르복시펩티다아제의 넓은 특이성은, 고등생물에서 보이는 특이한 번역 후 변형에 대조되게, 단백질의 재순환에서 역할을 할 것이라고 제시되었다. 카르복시펩티다아제 I의 넓은 기질 특이성은 단백질의 C-말단 서열 결정에서 유용하다. N-아세틸-레닌 기질을 이용하여, *P. furiosus* 카르복시펩티다아제가 Leu, Val, Phe, Tyr, Ser 및 His 잔기를 내보내면서 C-말단으로부터 7개의 잔기까지 서열을 결정할 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 카르복시펩티다아제에 속하는 카르복시펩티다아제 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 카르복시펩티다아제를 제공하는 것이다.

본 발명은 신규의 고호열성인 카르복시펩티다아제를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성

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

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

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

"등가의 핵산서열"에는 상기 카르복시펩티다아제 서열의 코돈 축퇴성 서열을 포함한다.

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

제 2 양태로, 본 발명은 카르복시펩티다아제를 제공한다. 보다 상세하게는 서열번호 2로 표시되는 카르복시펩티다아제 및 이의 기능적 동등물을 제공한다.

본 발명의 "기능적 동등물"에는 서열번호 2의 카르복시펩티다아제 효소 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 카르복시펩티다아제의 활성화에 직접 관여하지 않는 부분에 위치한다.

본 발명은, 제 3 양태로는 상기 카르복시펩티다아제를 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 카르복시펩티다아제를 암호화하는 분리된 DNA 분절을 포함하는 재조합 벡터로 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 바람직한 계는 대장균을 이용한다.

본 발명의 제 5 양태로는 상기 형질전환 세포, 또는 상기 *Thermococcus* sp.를 이용하여 카르복시펩티다아제를 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] TNA1_CP 유전자의 일차적 구조 및 재조합 효소의 발현

(1) 균주 및 성장 조건

Thermococcus sp. NA1은 이스트 마누스 바신(East Manus Basin)에 있는 파크마누스 지역(3° 14' S, 151° 42' E)에 있는 지역의 심해 열수 분출구로부터 분리되었다. YPS 배지가 DNA 조작을 위해서 *Thermococcus* sp. NA1을 배양하기 위하여 사용되었고, *Thermococcus* sp. NA1의 배양 및 균주 유지는 표준적인 방법에 의하여 행하여졌다. *Thermococcus* sp. NA1 시드(seed) 배양을 준비하기 위하여, 25ml 혈청 병에 있는 YPS 배지에 파타겔 플레이트(phytagel plate) 위에 형성된 단일 콜로니를 접종하였고, 20시간 동안 90°C에서 배양하였다. 시드 배양은 혐기적 단지(jar)에서 YPS 배지 700ml을 접종하는데 사용되었고, 20시간동안 90°C에서 배양되었다. 상기 고호열성 고세균 *Thermococcus* sp. NA1 (Bae et al)는 생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)에 2005년 10월 7일 기탁하여, 2005년 10월 20일에 KCTC 10859BP의 기탁번호를 부여받았다.

E. coli DH5α가 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) 카르복시펩티다아제-암호화 유전자의 클로닝 및 발현

*Nde*I 및 *Hind*III에 의해 플랭크(flank)된 *Thermococcus* sp. NA1(TNA1_CP)의 카르복시펩티다아제의 유전자의 전장 길이는 게놈 DNA와 두 개의 프라이머(센스 [5'-CGACCCGGCATATGGAGGAAGTTTTCCAGAACGAAACC-3'; 서열번호 3] 및 안티센스 [5'-CTCCACATAAGCTTGAGGTACCTCTCCTTCACCCAGCG-3'; 서열번호 4]; 상기 센스 프라이머 안에 이탤릭체로 된 서열이 *Nde*I 사이트이고, 안티센스 프라이머 안에 이탤릭체로 된 서열이 *Hind*III이다)를 이용하여 증

폭되었다. 증폭되어진 서열은 *NdeI* 및 *HindIII*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 카르복시펩티다아제를 가지고 있음이 확인되었다.

얻어진 플라스미드는 발현을 위해 *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL로 형질전환되었다. 카르복시펩티다아제 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 분리되었고, 조효소 샘플은 20분간 80°C에서 열처리되었다. 얻어진 상등액은 TALON™ 금속 친화성 레진(BD Bioscience Clontech, 파우로 알토, 캘리포니아)의 컬럼에 처리되고, 0.1 M KCl 및 10% 글리세롤을 포함하는 50mM 트리스-HCl 완충용액(pH 8.0)안의 10mM 이미다졸(시그마, 세이트 루이스, 미주리)로 세척되었고, TNA1_CP는 완충용액내의 300mM으로 용출되었다. 모아진 분획은, 다음으로, Centricon YM-10(밀리포어, 베드포드, 메사추세츠)을 이용하여 10% 글리세롤이 포함되어 있는 50mM 트리스-HCl(pH 8.0) 완충용액으로 완충용액 교환이 되어졌다.

단백질 농도는 $90,750 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 의 몰 흡광 계수를 이용하여 280nm에서의 흡광도로부터 측정되었다. 단백질의 정제도는 표준 방법으로 수행되어진 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동(SDS-PAGE) 분석에 의해서 조사되었다.

상기 지놈 서열분석을 통하여, 1,500 bp으로 구성되어진 오픈 리딩 프레임이 열안정성 카르복시펩티다아제 1에 유사한 단백질을 암호화하고 있는 것을 발견하였다. 이것은 TNA1_CP라 명명되었고, *P. furiosus* DSM 3638(84% 상동성), *T. aquaticus* YT-1 (35% 상동성) 및 *T. thermophilus* HB27 (35% 상동성)과 비교되었다(도 1). 암호화된 단백질은 59,198 Da의 예상되어진 분자량 및 pI 5.61을 가지는 499개의 아미노산으로 구성되어 있다. 시그널 펩타이드가 없기 때문에 세포 내 단백질인 것으로 보였고, 다른 패밀리 M32와 일관되었다. 비슷한 분석은 다른 고세균의 게놈 서열에서 카르복시펩티다아제와 상동성의 유전자가 존재하는 것을 보였고 이들의 유추된 아미노산 서열은 TNA1_CP(33 내지 93%)에 매우 높은 상동성을 보였다. 특별하게, *Thermococcus kodakaraensis*, *Pyrococcus horikoshii*, 및 *Pyrococcus abyssi*을 포함하는 Thermococcales로부터 것과 TNA1_CP(83에서 92%)와 매우 비슷하였다. 반대로, 상동성은 TNA1_CP 및 세균 오쏘로고(29 내지 37% 상동성) 사이에 매우 낮았다. TNA1_CP와 이의 상동체의 서열 어라인먼트는 *P. furiosus* CP로부터 얻어진 데이터에 기초하여 HEXXH 모티프에 추가하여 5개의 모티프를 보였다. 그리고 IRXXAD로부터의 하나의 아미노산 A354가 S354로 교환되어진 것을 제외하고는 잘 보존되었다. TNA1_CP의 촉매부위를 형성하는 양성자 셔틀(E270) 및 단백질 리간드(H269, H273, 및 E299)가 잘 보존되어 있었다.

TNA1_CP 유전자는 PCR로 증폭되어졌고, 발현된 효소는 용해성 세포 추출액으로부터 정제되어졌다. SDS/PAGE에 의한 분석은 61 kDa 단백질을 보이고(도 2), 이것은 59.2 kDa CP 단백질 및 단백질의 C-말단에 있는 KLAAALEH₆-(His₆-태그)에 상응하는 1.5kDa 펩타이드로 구성되는 융합 생성물의 예상되어진 사이즈이었고, 정제된 샘플의 주된 성분이었다.

[실시예 2] 카르복시펩티다아제 효소의 생화학적 성질

(1) 카르복시펩티다아제 효소 활성 측정방법

TNA1_CP 활성도는 N-Cbz-알라닐-아르기닌 (Z-Ala-Arg)(Bachem AG, 부벤도르프, 스위스)의 분해를 측정하여서 분석하였다. 분석 혼합액(250 μ l)에는 50 mM KMES(포타슘 2-[N-모르포리노]에탄설포산) 완충용액(pH 6.5), 0.4 mM CoCl₂ 및 8 mM 기질이 포함된다. 반응은 효소의 첨가로 시작되고 80°C에서 10분간 항온보관되었다가 얼음위에서 반응정지되었다. 연속해서, 카드뮴-닌히드린 리전트가 첨가되어지고, 시료는 발색을 위해서 추가로 80°C에서 5분간 항온배양되었고, 얼음에서 반응정지되었다. 흡광도는 500nm에서 읽어졌고, 효소활성은 아르기닌 표준 커브를 사용하여 계산되었다. 활성의 1 단위는 80°C에서 Z-Ala-Arg에서 아르기닌 1 μ mole을 방출하는 양으로 정의된다. 다른 Z-Ala-X 아미노산 기질(X=Ala, Asp, His, Leu, Met, Asn, Pro, Val 및 Tyr) 다른 것은 같은 조건에서 행하여졌고, 적절한 아미노산이 표준 커브를 만드는데 이용되었다.

(2) 분리되어진 TNA1_CP의 생화학적 특성 분석

TNA1_CP의 기능성은 Z-Ala-Arg을 가수분해할 수 있는 능력에 의해서 확인되었고, 상기 기질은 모든 보통의 분석에서 사용되었다. 카르복시펩티다아제 활성은 고온에서 강하게 촉진되었고, 70-80°C에서 최적 활성을 보였다. 그러나, 80°C을 넘어가게 되면 급격하게 활성이 감소하였다(도 3 참조). TNA1_CP의 pH에 대한 영향은 다른 완충용액을 이용하여 측정되었다. 즉, 소듐 아세테이트 (pH 4.0-5.0), KMES (pH 5.5-6.5), HEPES(N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid) (pH 7-7.50, 트리스-HCl (pH 8-10)을 사용하였다. 최적 pH는 6.5 이었다(도 3B 참조). 진정세균 *T. aquaticus*로부터의 카르복시펩티다아제 Taq는 최적 pH가 8인 반면에, *P. furiosus* CP 및 TNA1_CP는 최적 pH가 6.5이라는 것에 주목할 필요가 있다.

도 1에서 보여주듯이, 금속 결합을 위한 단백질 리간드는 HEXXH 모티프 및 HESQ 서열에 보존되어 있었다. 이것은 TNA1_CP는 금속이온에 영향을 받을 것이라는 것을 의미한다. 효소 용액에 Co^{2+} 의 첨가는 효소 활성을 3.7 배 증가시켰다. 그러나, Co^{2+} 이온의 효과는 다른 2가 이온(Ba^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , 및 Zn^{2+})에 의해 대체되지 않았다(도 4). 대조구는 Co^{2+} 의 첨가전에 잔류 활성을 보였는데, 아마도 Co^{2+} 와 강한 결합 또는 완충 용액 교환 후에 잔류하는 금속 이온에 의한 것일 것이다. 카르복시펩티다아제 활성도는 EDTA (1mM)의 금속 킬레이트제가 있는 곳에서는 관찰되지 않았다. 카르복시펩티다아제 Taq는 $Co^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+} > Cu^{2+} > Zn^{2+}$ 의 순서로 금속 이온에 의해 활성화 되었고, *T. thermophilus* 카르복시펩티다아제는 이것의 활성을 위하여 Zn^{2+} 또는 Co^{2+} 같은 2가 금속이온이 필요했다. 반면에, *P. furiosus* CP는 Co^{2+} 에 의해 활성화되었고, Zn^{2+} 에 의해 활성화되지 않았다. TNA1_CP의 금속 요구는 *P. furiosus* 카르복시펩티다아제의 것과 비슷하였다. *P. furiosus* CP 및 *T. thermophilus* CP는 결정구조에서 Pb^{2+} , Yb^{2+} , Mg^{2+} 및 Zn^{2+} 같은 여러종류의 금속 이온과 결합되어 있었고, TNA1_CP를 포함한 이들 카르복시펩티다아제의 생물학적으로 관련된 금속이온이 어떤 것인지에 대한 추가 연구가 필요하다.

Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} 및 Zn^{2+} 가 50% 이하로 잔류 활성을 감소시키는 결과를 바탕으로(도 4), TNA1_CP는 금속이온으로 처리되었고, Co^{2+} 가 금속이온에 대한 억제효과를 보기위해서 첨가되었다. 도 4에서 보이듯이, Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} 및 Zn^{2+} 의 억제 효과는 Co^{2+} 의 존재에 의해서 극복되지 않았고, 이것은 억제 금속 이온이 Co^{2+} 의 자리에 TNA1_CP에 강하게 결합하고, 아마도 구조적 변화를 동반할 것이라는 것을 제시한다. 한편 Ba^{2+} 및 Mn^{2+} 는 거의 영향이 없었으며, Ca^{2+} 와 Mg^{2+} 는 TNA1_CP의 활성화에 거의 영향이 없었다.

TNA1_CP의 열안정성은 0.2mM $CoCl_2$ 를 포함하는 KMES 완충용액(pH 6.5)에서 80°C 및 90°C에서 100분까지 효소를 항온반응하여서 평가하였다. TNA1_CP는 80°C에서 84분의 반감기($t_{1/2}$)로 활성을 잃어버렸고(도 5참고), 이것은 *P. furiosus* CP(40분)보다 더 안정적이었다. TNA1_CP의 열안정성은 Co^{2+} 의 존재에 의해서 영향을 받았다. 가열 동안에 반응에서 Co^{2+} 의 결핍은 TNA1_CP의 반감기를 80°C 및 90°C에서 반감기를 각각 7.4분 및 5.0분으로 감소시켰으며, 이것은 Co^{2+} 가 결합된 TNA1_CP의 구조가 더 안정적이라는 것을 의미한다. Co^{2+} 가 없이는, 열처리(80°C에서 20분까지)에 TNA1_CP 활성화가 관찰되지 않았고, 80°C에서 효소가 급격하게 불활성화된다는 것을 의미한다. 첩(Cheng) 등은 *P. furiosus* CP가 사이클릭-2,3-디포스포글리세레이트, 디-미오-이노시톨-1,1-포스페이트 및 만노실 글리세레이트 같은 염에 의해 생체내에서 안정화된다고 주장하였다. 그러나, 시험관내에서 12.5% 글리세롤의 보충은 양 온도에서 TNA1_CP의 불활성화를 보호하지 못했다.

TNA1_CP는 염기성, 지방성, 및 방향성의 C-말단 아미노산에 대하여 선호하는 상대적으로 넓은 특이성을 보였다(표1 참조).

[표 1] Z-Ala-X 기질로 결정되어진 TNA_CP 및 *P. furiosus*의 기질 특이성

기 질	가수분해 비율(%)	
	TNA1_CP	<i>P. furiosus</i> CP ⁴⁾
Z-Ala-Arg	100	100
Z-Ala-Leu	62	27
Z-Ala-Met	49	61
Z-Ala-Tyr	24	12
Z-Ala-Ala	16	14
Z-Ala-Val	12	6

* 모든 값은 각각의 단백질에 대하여 Z-Ala-Arg(100%)의 가수분해 속도의 상대적인 비율로 표현되었다.

Z-Ala-Asp, Z-Ala-Pro, Z-Ala-His 및 Z-Ala-Asn에 대하여, 표준 조건에서 어떤 활성도 관찰되지 않았다. *P. furiosus* 와 비교하면, 선호도는 비슷한 패턴이었으나, 같지는 않았다. TNA1_CP는 Arg>Leu>Met>Tyr>Ala>Val의 선호도를 가졌으나, *P. furiosus*는 Arg>Met>Leu>Ala>Tyr>Val의 선호도를 가졌다. 우메추(Umetsu) 등에 따르면, 가수분해 속도는 기질의 C-말단의 두 번째 위치의 아미노산에 두드러지게 영향을 받는다. 따라서, Z-Ala-X(X=Asp, Pro, His 및 Asn)의 Ala 대신에 다른 아미노산 기질은 기질의 분해를 촉진시킬 수 있다. 넓은 기질 특이성을 보이는 많은 카르복시펩티다아제가 보고되었다. C-말단에서의 아미노산의 선호도에 기초하여, *Penicillium janthinellus* CP, 세린 카르복시펩티다아제의 일종 및 *Thermoactinomyces* sp.로부터의 카르복시펩티다아제 T는 염기성 및 소수성 C-말단 아미노산 잔기로 구성되어진 펩타이드 결합을 절단하고, 반면에, 카르복시펩티다아제 A 및 카르복시펩티다아제 C 및 카르복시펩티다아제 B 및 카르복시펩티다아제 D는 각각 소수성 및 염기성 잔기에 대하여 강한 선호도를 보였다.

Z-Ala-Arg을 사용하여 동력학적 분석이 행하여졌고, K_m (1.4mM), V_{max} (11.4 $\mu\text{mole}/\text{분}/\text{mg}$), 및 K_{cat} (11.6 s^{-1}) 값 같은 동력학적 수치는 측정된 활성도로부터 계산되었다(도 6). *P. furiosus*의 것($K_m = 0.9\text{mM}$, $V_{max} = 2300 \mu\text{mole}/\text{분}/\text{mg}$ 및 $k_{cat} = 600 \text{s}^{-1}$)과 비교하면, TNA1_CP는 Z-Ala-Arg에 대하여 80배 낮은 촉매 효율을 보였다.

발명의 효과

본 발명에 따른 단백질 분해 효소는 고호열성인 신규한 단백질 분해효소들이다.

카르복시펩티다아제 I의 넓은 기질 특이성은 단백질의 C-말단 서열 결정에서 유용하다. N-아세틸-레닌 기질을 이용하여, *P. furiosus* CP가 Leu, Val, Phe, Tyr, Ser 및 His 잔기를 내보내면서 C-말단으로부터 7개의 잔기까지 서열을 결정할 수 있다.

참고문헌

- 1) Rawlings, N. D., and Barrett, A. J., Evolutionary families of metallopeptidases. *Methods Enzymol.* 248, 183-228 (1995).
- 2) Lee, S. H., Minagawa, E., Taguchi, H., Matsuzawa, H., Ohta, T., Kaminogawa, S., and Yamauchi, K., Purification and characterization of a thermostable carboxypeptidase (carboxypeptidase *Taq*) from *Thermus aquaticus* YT-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56, 1839-1844 (1992).

- 3) Nagata, K., Tsutsui, S., Lee, W. C., Ito, K., Kamo, M., Inoue, Y., and Tanokura, M., Crystallization and preliminary X-ray analysis of carboxypeptidase 1 from *Thermus thermophilus*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 60, 1445-1446 (2004).
- 4) Cheng, T. C., Ramakrishnan, V., and Chan, S. I., Purification and characterization of a cobalt-activated carboxypeptidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Protein Sci.* 8, 2474-2486 (1999).
- 5) Stepanov, V. M., Carboxypeptidase T. *Methods Enzymol.* 248, 675-683 (1995).
- 6) Colombo, S., D'Auria, S., Fusi, P., Zecca, L., Raia, C. A., and Tortora, P., Purification and characterization of a thermostable carboxypeptidase from the extreme thermophilic archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. *Eur. J. Biochem.* 206, 349-357 (1992).
- 7) Hartsuck, J. A., and Lipscomb, W. N., Carboxypeptidase A, p. 1-56. In P. D. Boyer (ed.), *The enzymes*, 3rd ed. Vol. 3. Academic Press, New York. (1971).
- 8) Folk, J. E., Carboxypeptidase B, p. 57-79. In P. D. Boyer (ed.), *The enzymes*, 3rd ed. Vol. 3. Academic Press, New York. (1971).
- 9) Levin, Y., Skidgel, R. A., and Erdos, E. G., Isolation and characterization of the subunits of human plasma carboxypeptidase N (kininase i). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 79, 4618-4622 (1982).
- 10) Fricker, L. D., and Snyder, S. H., Enkephalin convertase: purification and characterization of a specific enkephalin-synthesizing carboxypeptidase localized to adrenal chromaffin granules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 79, 3886-3890 (1982).
- 11) Sonnleitner, B., and Fiechter, A., Advantages of using thermophiles in biotechnological processes: expectations and reality. *Trends Biotechnol.* 1, 74-80 (1983).
- 12) Cowan, D., Daniel, R., and Morgan, H., Thermophilic proteases: Properties and potential applications. *Trends Biotechnol.* 3, 68-72 (1985).
- 13) Sambrook, J., and Russell, D. W., *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001).
- 14) Doi, E., Shibata, D., and Matoba, T., Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay. *Anal. Biochem.* 118, 173-184 (1981).
- 15) Robb, F. T., Maeder, D. L., Brown, J. R., DiRuggiero, J., Stump, M. D., Yeh, R. K., Weiss, R. B., and Dunn, D. M., Genomic sequence of hyperthermophile, *Pyrococcus furiosus*: implications for physiology and enzymology. *Meth. Enzymol.* 330, 134-157 (2001).
- 16) Arndt, J. W., Hao, B., Ramakrishnan, V., Cheng, T., Chan, S. I., and Chan, M. K., Crystal structure of a novel carboxypeptidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Structure (Camb).* 10, 215-224 (2002).
- 17) Lee, S. H., Taguchi, H., Yoshimura, E., Minagawa, E., Kaminogawa, S., Ohta, T., and Matsuzawa, H., Carboxypeptidase Taq, a thermostable zinc enzyme, from *Thermus aquaticus* YT-1: molecular cloning, sequencing, and expression of the encoding gene in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 58, 1490-1495 (1994).

- 18) Fukui, T., Atomim H., kanai, T., Matsumi, R., Fujiwara, S., and Imanaka, T., Complete genome sequence of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 and comparison with *Pyrococcus* genomes. *Genome Res.* 15, 352-363 (2005).
- 19) 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., and Kikuchi, H., Complete sequence and gene organization of the genome of a hyper-thermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus horikoshii* OT3. *DNA Res.* 30, 55-76 (1998).
- 20) Cohen, G. N., Barbe, V., Flament, D., Galperin, M., Heilig, R., Lecompte, O., Poch, O., Prieur, D., Querellou, J., Ripp, R., Thierry, J. C., Van der Oost, J., Weissenbach, J., Zivanovic, Y., and Forterre, P., An integrated analysis of the genome of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Mol. Microbiol.* 47, 1495-1512 (2003).
- 21) Umetsu, H., Hishinuma, K., Wake, H., and Ichishima, E., Production, purification, and properties of serine carboxypeptidase from *Paecilomyces carneus*. *Curr. Microbiol.* 33, 44-48 (1996).
- 22) Colombo, S., D'Auria, S., Fusi, P., Zecca, L., Raia, C. A., and Tortora, P., Purification and characterization of a thermostable carboxypeptidase from the extreme thermophilic archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. *Eur. J. Biochem.* 206, 349-357 (1992).
- 23) Breddam, K., Carboxypeptidase S-1 from *Penicillium janthinellum*: enzymatic properties in hydrolysis and aminolysis reactions. *Carlsberg Res. Commun.* 53, 309-320 (1988).
- 24) Osterman, A. L., Stepanov, V. M., Rudenskaia, G. N., Khodova, O. M., and Tsaplina, I. A., Carboxypeptidase T-intracellular carboxypeptidase of *Thermoactinomyces*-a distant analog of animal carboxypeptidase. *Biokhimiia.* 49, 292-301 (1984).
- 25) Remington, S. J., and Breddam, K., Carboxypeptidases C and D. *Methods Enzymol.* 244, 231-248 (1994).

도면의 간단한 설명

도 1은 M32 패밀리 카르복시펩티다아제의 서열분석을 보여준다. 대시는 갭(gap)을 의미하고, 오른쪽에 있는 숫자는 원래 서열에서 마지막 잔기의 위치를 나타낸다. 4개의 효소 사이의 같은 잔기는 *로 나타내었고, 보전된 치환 및 반보전된 치환은 각각 : 및 . 으로 나타내었다. 보전된 모티프가 238-240(HPF), DXRXT(248-252), HESQ(298-301), HEXXH(269-273), IRXXD (350-355) 및 GXXQDXHW (405-412)에서 나타났다. *Thermococcus* sp. NA1(T. NA1)으로부터의 카르복시펩티다아제의 퍼센트 동일성과 접근번호는 다음과 같다: *P. furiosus* DSM 3638(NP_578185), 84%; *T. aquaticus* YT-1 (P42663), 35%; 및 *T. thermophilus* HB27(YP_005684), 35%

도 2는 정제된 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 카르복시펩티다아제(이하 TNA1_CP라 부름)의 활성에 대한 온도(A) 및 pH (B)의 효과를 나타낸다. A: 시료온도를 30 에서 100°C 까지 증가시키며, 표준상태에서 활성분석을 수행하였다. B, C: 소듐 아세트산, pH 4-6; KMES, pH 5.5-6.5; HEPES, pH 7-8의 완충용액, 트리스-HCl, pH 8.0-10.0(각각 50mM) 완충용액을 사용하였고 표준상태에서 활성분석을 실시하였다.

도 4는 TNA1_CP의 활성에 대한 금속 이온의 효과를 보인다. 여러 가지 금속이온(0.2mM) 및 EDTA(1mM)을 단독 또는 CO²⁺ (0.2mM)과 조합으로 투석여과된 효소 용액에 첨가되면서 표준 조건에서 활성도 분석이 행하여졌다. (-)는 어떤 금속이온도 넣지 않은 대조구이다.

도 5는 TNA1_CP의 안정성에 대한 온도의 효과를 보인다. TNA1_CP는 0.2 mM CoCl₂를 함유하는 50 mM 소듐 아세트산 완충용액, pH 6.5에서 80°C (○) 및 90°C (●)에서 배양하였다. 도면에 나타난 시간에, 일정분량의 시료를 채취하였고, 그 활성을 Z-Ala-Arg을 기질로 사용하여 80°C에서 동일한 완충용액 내에서 측정하였다.

도 6은 TNA1_CP의 활성도에 대한 증가된 기질농도의 효과를 보인다. Z-Ala-Arg의 양이 증가되면서 표준조건에서 활성도가 측정되었다.

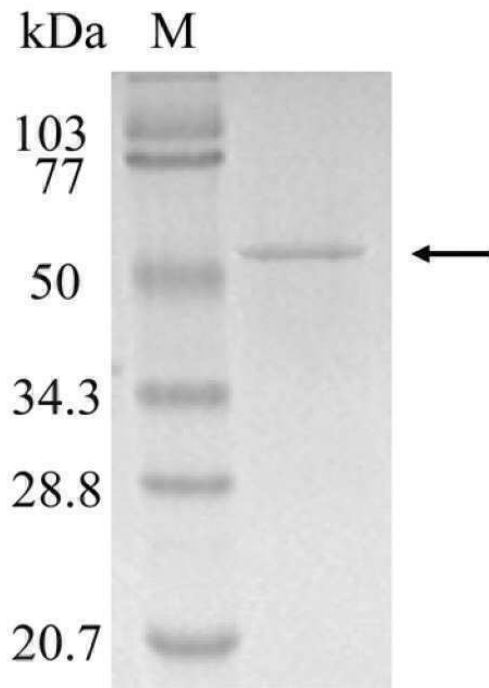
도 7은 본 발명에 따른 재조합 카르복시펩티다아제 효소를 가지고 있는 재조합플라스미드의 개열지도를 보인다.

도면

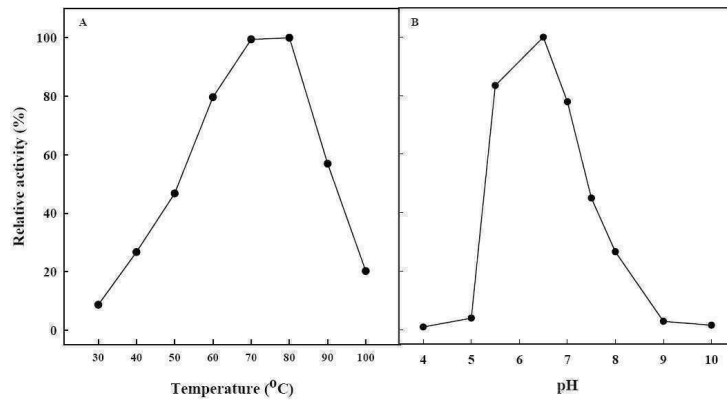
도면1

<i>T. NAI</i>	MEEVFQNETIKQILAKYRRIWAISHARSVLGDWMEVNMPEGIFERSVAQGELSVLSQEF	60
<i>P. furiosus</i>	MEEVFQNETIKQILAKYRRIWAIGHAQSVLGDWLEVNMPKEGILERSVAQGELSVLSHEL	60
<i>T. aquaticus</i>	---MTPEAAYQNLEFPQRETAIYLSLGAALAWDQRTMIPKKGHHRARQMAALARLLHER	57
<i>T. thermophilus</i>	---MTPEAAYQNLEFPQRETAIYLSLGAALAWDQRTMIPKKGHHRARQMAALARLLHQR	57
	: : : : : * * * . . . : : : * * * . . . : : * * * . . . : : * * * . . . : : * * * . . .	
<i>T. NAI</i>	LLKPEFVNLVEKAG---IEDLNEYERGVVRLDRSIRISKSFPPEFLREMSEVTSQATK	117
<i>P. furiosus</i>	LLKPEFVNLVEKAG---LENLNEYERGVVRLDRSIRIARAFPPFIREVSEVTSQATK	117
<i>T. aquaticus</i>	ATDPRIGEWLEKVEGSSLVEDPLSDAAVNVRAWRAYERARAIPELAVELAQARSEGTT	117
<i>T. thermophilus</i>	MTDPRIGEWLEKVEGSSLVQDPLSDAAVNVREWRQAYERARAIPELAVELAQAESEAES	117
	. * . : : : * * * . . . : : : . * * * . . . : : : * * * . . . : : * * * . . .	
<i>T. NAI</i>	AWEEAKRTNDYSKFEPLWLDRIIDLAKRAADYLGYE-----DEPYDALLDLFEEGTT	168
<i>P. furiosus</i>	AWEEAKAKDDFSKFEPLWLDKIISLAKRAAEYLGYE-----EPPYDALLDLFEEGLR	168
<i>T. aquaticus</i>	AWEARPRDDWQGFPLPKRLEFALAKEEAEILMAVGPDPDPPYGELYDALLDGYEPGAR	177
<i>T. thermophilus</i>	FWEEARPRDDWQGFPLPKRVYALTKEKAEVLFALPPAGDPPYGELYDALLDGYEPGMR	177
	* * : : * * : * * * . . . : : * * * . . . : : * * * . . . : : * * * . . .	
<i>T. NAI</i>	TRDVERMFKKLEKELKPLEKIMDEGKVPQSHPLEKEKYKREQMERVNLWILEKFGFPLG	228
<i>P. furiosus</i>	TRDVEKMFVLEKELKPLEKIMDEGKVPREHPLEKEKYREWEMERVNLWILQKFGFPLG	228
<i>T. aquaticus</i>	ARDLEPLFRELSSGLKGLLDRILGSGRRPDVGVLRH-HYPKEAQRFALELLQACGYDLE	236
<i>T. thermophilus</i>	ARELLPLFAELKEGLKGLLDRILGSGRRPDTILHR-PYPVEAQRFALELLSACGYDLE	236
	: * . : : * * * . . . : : * * * . . . : : * * * . . . : : * * * . . .	
<i>T. NAI</i>	VRSRLDVS AHP FTTEFGIR DVRIT RYEGYDFRRTILSTV HEFG HALYELQDDEFMFSP	288
<i>P. furiosus</i>	TRARLDVS AHP FTTEFGIR DVRIT RYEGYDFRRTILSTV HEFG HALYELQDDEFMFSP	288
<i>T. aquaticus</i>	AG-RLDPT AHP FEIAG GDVRIT RYEYDFNAGIFGTL HEMG HALYEQGLPEAHWGTE	295
<i>T. thermophilus</i>	AG-RLDPT AHP FEIAG GDVRIT RYEYDFNAGIFGTL HEMG HALYEQGLPEAHWGTE	295
	. * * * : * * * . . . : * * * * * * * * * . . . : * * * * * * * * * . . . : * * * . . .	
<i>T. NAI</i>	IAGGVSLGI HE SQSRFWENVIGRSREFAELIHPVLKENLPMANYTPEDVYLYFNMVRPD	348
<i>P. furiosus</i>	IAGGVSLGI HE SQSRFWENIIGRSKEFVELIYVPLKENLPMNSYTPEDVYLYFNVVRPD	348
<i>T. aquaticus</i>	RGEAASLV HE SQSRWENLVGRSLGFWERFFPRAKEVFSLSLADVRLDHFHAVNAVEPS	355
<i>T. thermophilus</i>	RGDVAVSL HE SQSRWENLVGRSLGFWERFFPRAEVSFSLGDSVLEDFHAVNAVEPS	355
	. . . * * * : * * * * * * * * * . . . : * * * . . . : * * * . . . : * * * . . .	
<i>T. NAI</i>	FIRTESDVVTYNFHILLRFKLERMMLNEGKARDLPELWNEEMERLLGIRPKTYAEGILQ	408
<i>P. furiosus</i>	FIRTEADVVTYNFHILLRFKLERMMLNEGKARDLPEMWNEMERLLGIRPKYSEGITQ	408
<i>T. aquaticus</i>	LIRVEADVVTYNHILVRLELELALFRGELFLEDLPEAWREKYRAYLGVAPRDYKDGVMQ	415
<i>T. thermophilus</i>	LIRVEADVVTYNHILVRLELELALFRGELSPEDLPEAWAEKYRDLGVAPKDYKDGVMQ	415
	: * * . * * * * * * * * * : * * * . . . : * * * * * * * * * . . . : * * * . . .	
<i>T. NAI</i>	DIHWAGHTVGYEPTYSIGTLLSAQIYHMKRDIPEFEKVARAEFEPKAWLREKIRHWG	468
<i>P. furiosus</i>	DIHWAGHSIGYEPPTYIGTLLSAQIYHMKRDIPEFEKVARAEFEPKAWLREKIRHWG	468
<i>T. aquaticus</i>	DVHWGGMGYEPPTYTLGNLYAAQFFAKAEELGPLELFEARGEFTPLDWRTRRIHAE	475
<i>T. thermophilus</i>	DVHWAGGLPGYEPPTYTLGNLYAAQFFQKAEAEELGPLELFEARGEFTPLDWRTRRIHAE	475
	* * * * * * * * * * * * * * * : * * * . . . : * * * * * * * * * . . . : * * * * * * * * * . . .	
<i>T. NAI</i>	SIYPPKDLLKKAIGEELNPEYFVRWVKERYL---- 499	
<i>P. furiosus</i>	SIYPPKDLLKKAIGEDMDPEYFVRWVKERYL---- 499	
<i>T. aquaticus</i>	SRFRPRALVERVTGSPGAQFLRYLEAKYCALYGF 511	
<i>T. thermophilus</i>	SRFRPRALVERVTGEAPSARFFLAYLEKRYAALYG- 510	
	* : * * * * * * * * . . . : * * * . . . : * * * . . .	

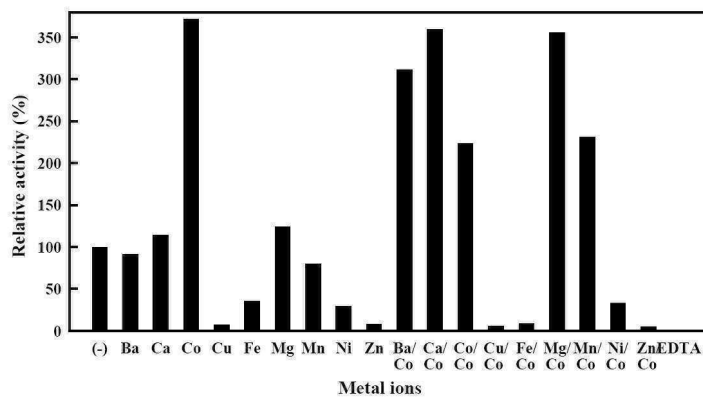
도면2



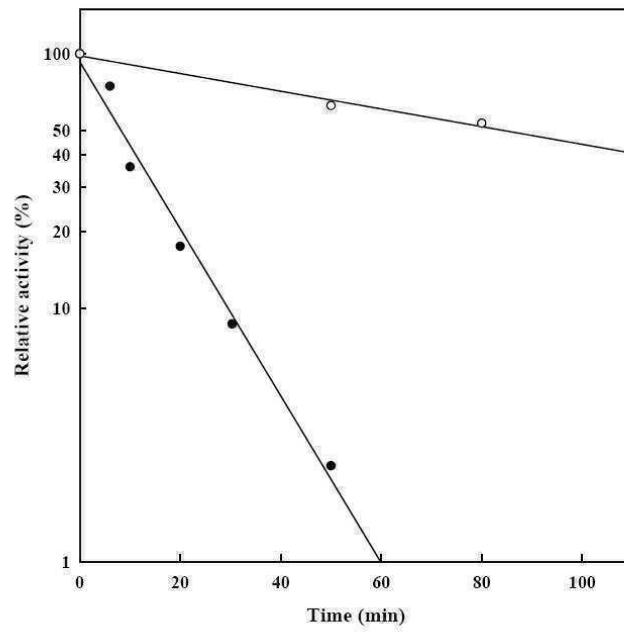
도면3



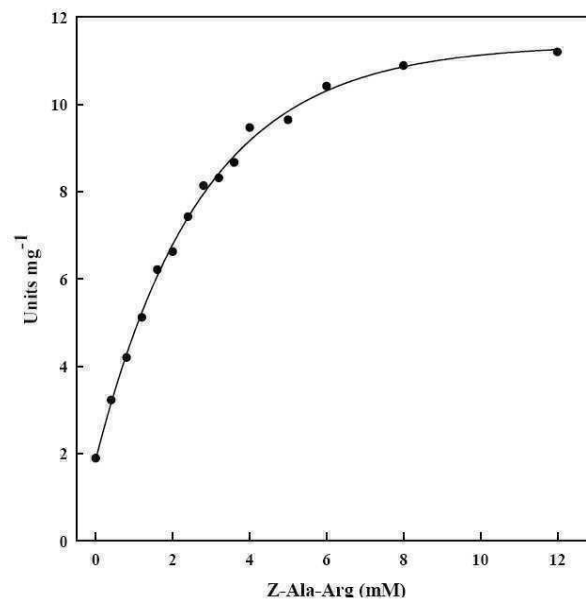
도면4



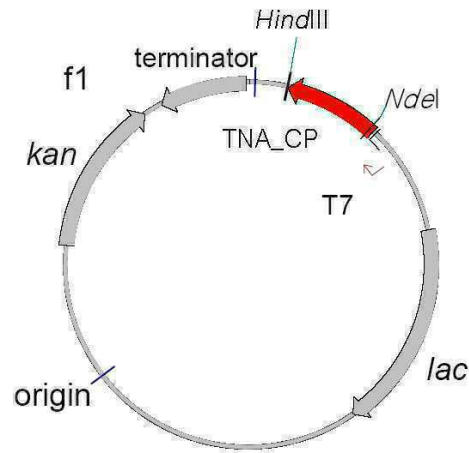
도면5



도면6



도면7



서열목록

<110>	KOREA OCEAN RESEARCH AND DEVELOPMENT INSTITUTE	
<120>	Hyperthermophilic Carboxypeptidase and Methods of Preparation Thereof	
<160>	4	
<170>	KopatentIn 1.71	
<210>	1	
<211>	1500	
<212>	DNA	
<213>	Thermococcus sp.	
<400>	1	
	atggaggaag ttttccagaa cgaaccatc aagcagattc tcgccaagta taggcgcatc	60
	tgggccatta gccacgcccg gagcgtcctt ggctgggaca tggaggtaa catgcctaga	120
	gagggcatat tcgagcgtc cgttgcccag ggtgagctga gcgttctcag ccaggagttc	180
	ctcctcaagc ccgagttcgt cgagctcgtc gagaaggcga agggaatcga agacctcaac	240
	gagtacgagc gcggcgtcgt tcgcgtcctc gaccgctcaa tcaggataag caagtccttc	300
	ccacctgagt tcctcagga gatgagcgag gtaacgagcc aggcaacgaa agcatgggaa	360
	gaggctaaaa gaaccaacga ctactccaag ttcgagcctt ggctcgacag aatcatagac	420
	ctcgccaaga gggccgctga ctacctggc tacgaggagc agccttacga tgcctgctc	480
	gatctctttg aggaggggac aaccacaaga gacgtcgaaa gaatgttcaa aaagctggag	540

aaggagctca aaccgctcct cgaaaagata atggacgagg gaaaggttcc gcagagccac 600
 ccgctcgaaa aggagaagta caagagggag cagatggagc gcgttaacct ctggattttg 660
 gagaagtctg gctttccgct cggcgtccgc togaggcttg acgtctcggc ccatccgttc 720
 accacggagt ttggcataag ggacgtcagg ataacgacca gatacgaggg ctacgacttt 780
 aggaggacca tactgagcac tgtccacgag ttcgggtcatg ccctctacga gctccagcag 840
 gatgagcgct tcatgttcag tccgatcgct ggaggtgtct cccttggaat ccatgagagc 900
 cagagcaggt tctgggagaa cgtaatcgga aggagcaggg agttcgccga gctgattcac 960
 ccagtgtca aggaaaacct gccgttcatg gccaaactaca cgcccgagga tgtttacctc 1020
 tacttcaaca tggtcaggcc ggacttcatac aggacagagt ctgatgttgt aacctacaac 1080
 ttccacatac tccttcgctt caagctcgag aggatgatgc tcaacgaggg cgtcaaggcg 1140
 aaagatctcc ctgagctctg gaacgaggag atggagaggg tcctcggcat aaggccaag 1200
 acctacgccg agggaatact ccaggacatc cactgggccc acgggacggg cggctacttc 1260
 ccgacctaca gcatcggaac gtcctttca gcgcagatat actaccacat gaagagggac 1320
 attccggact tcgaggagaa ggttgccaga gccgagttcg agcccatcaa ggcttggtg 1380
 agggaaaaga tacaccgctg gggcagcatc taccaccga aggatctctt aaagaaggcc 1440
 atcggagagg agctgaaccg ggagtacttc gtccgctggg tgaaggagag gtacctctga 1500
 1500

<210> 2
 <211> 499
 <212> PRT
 <213> Thermococcus sp.

<400> 2
 Met Glu Glu Val Phe Gln Asn Glu Thr Ile Lys Gln Ile Leu Ala Lys
 1 5 10 15
 Tyr Arg Arg Ile Trp Ala Ile Ser His Ala Arg Ser Val Leu Gly Trp
 20 25 30
 Asp Met Glu Val Asn Met Pro Arg Glu Gly Ile Phe Glu Arg Ser Val
 35 40 45
 Ala Gln Gly Glu Leu Ser Val Leu Ser Gln Glu Phe Leu Leu Lys Pro
 50 55 60

Glu Phe Val Glu Leu Val Glu Lys Ala Lys Gly Ile Glu Asp Leu Asn
 65 70 75 80
 Glu Tyr Glu Arg Gly Val Val Arg Val Leu Asp Arg Ser Ile Arg Ile
 85 90 95
 Ser Lys Ser Phe Pro Pro Glu Phe Leu Arg Glu Met Ser Glu Val Thr
 100 105 110
 Ser Gln Ala Thr Lys Ala Trp Glu Glu Ala Lys Arg Thr Asn Asp Tyr
 115 120 125
 Ser Lys Phe Glu Pro Trp Leu Asp Arg Ile Ile Asp Leu Ala Lys Arg
 130 135 140
 Ala Ala Asp Tyr Leu Gly Tyr Glu Asp Glu Pro Tyr Asp Ala Leu Leu
 145 150 155 160
 Asp Leu Phe Glu Glu Gly Thr Thr Thr Arg Asp Val Glu Arg Met Phe
 165 170 175
 Lys Lys Leu Glu Lys Glu Leu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ile Met Asp
 180 185 190
 Glu Gly Lys Val Pro Gln Ser His Pro Leu Glu Lys Glu Lys Tyr Lys
 195 200 205
 Arg Glu Gln Met Glu Arg Val Asn Leu Trp Ile Leu Glu Lys Phe Gly
 210 215 220
 Phe Pro Leu Gly Val Arg Ser Arg Leu Asp Val Ser Ala His Pro Phe
 225 230 235 240
 Thr Thr Glu Phe Gly Ile Arg Asp Val Arg Ile Thr Thr Arg Tyr Glu
 245 250 255
 Gly Tyr Asp Phe Arg Arg Thr Ile Leu Ser Thr Val His Glu Phe Gly
 260 265 270
 His Ala Leu Tyr Glu Leu Gln Gln Asp Glu Arg Phe Met Phe Ser Pro
 275 280 285
 Ile Ala Gly Gly Val Ser Leu Gly Ile His Glu Ser Gln Ser Arg Phe
 290 295 300
 Trp Glu Asn Val Ile Gly Arg Ser Arg Glu Phe Ala Glu Leu Ile His
 305 310 315 320
 Pro Val Leu Lys Glu Asn Leu Pro Phe Met Ala Asn Tyr Thr Pro Glu
 325 330 335
 Asp Val Tyr Leu Tyr Phe Asn Met Val Arg Pro Asp Phe Ile Arg Thr

340	345	350	
Glu Ser Asp Val Val Thr Tyr Asn Phe His Ile Leu Leu Arg Phe Lys			
355	360	365	
Leu Glu Arg Met Met Leu Asn Glu Gly Val Lys Ala Lys Asp Leu Pro			
370	375	380	
Glu Leu Trp Asn Glu Glu Met Glu Arg Leu Leu Gly Ile Arg Pro Lys			
385	390	395	400
Thr Tyr Ala Glu Gly Ile Leu Gln Asp Ile His Trp Ala His Gly Thr			
405	410	415	
Val Gly Tyr Phe Pro Thr Tyr Ser Ile Gly Thr Leu Leu Ser Ala Gln			
420	425	430	
Ile Tyr Tyr His Met Lys Arg Asp Ile Pro Asp Phe Glu Glu Lys Val			
435	440	445	
Ala Arg Ala Glu Phe Glu Pro Ile Lys Ala Trp Leu Arg Glu Lys Ile			
450	455	460	
His Arg Trp Gly Ser Ile Tyr Pro Pro Lys Asp Leu Leu Lys Lys Ala			
465	470	475	480
Ile Gly Glu Glu Leu Asn Pro Glu Tyr Phe Val Arg Trp Val Lys Glu			
485	490	495	
Arg Tyr Leu			

<210> 3
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Carboxypeptidase sense primer

<400> 3
 cgacccggca tatggaggaa gttttccaga acgaaacc

38

<210> 4
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Carboxypeptidase antisense primer

<400> 4
ctccacataa gcttgaggta cctctccttc acccagcg

38