



(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 10-2007-0046636
(43) 공개일자 2007년05월03일

(21) 출원번호 10-2005-0103488
(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) 고흡열성 아미노펩티다아제 P 효소 및 이의 제조방법

(57) 요약

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

청구항 6.

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

청구항 7.

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

청구항 8.

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

청구항 9.

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

아미노펩티다제 P

아미노펩티다제 P (APP; X-Pro 아미노펩티다제 EC 3.4.11.9)는 말단에서 두 번째 잔기가 프롤린(proline)인 펩티드로부터 N-말단의 아미노산을 제거하는 펩티다아제이다. APP의 특이성을 갖는 효소가 처음으로 *Escherichia coli*로부터 정제된 이래로, APP는 세균, 선충 및 몇몇의 포유류의 조직을 포함하는 광범위한 생물원으로부터 특징이 분석되었다. 세균에서의 APP의 생리학적 역할은 명백하지 않지만, 포유류의 APP는 콜라겐의 단백질 재편성 및 물질 P 및 브라디키닌(bradykinin) 같은 생물학적으로 활성이 있는 펩타이드의 조절에 관련이 있다. 상당수의 lactococcal 균주들로부터 APP는 펩타이드를 분해하여 이를 치즈 기질에 방출하는데 관여함으로써 치즈의 성숙과정에서 쓴맛을 없애는데 기여하는 것으로 보고되었다. 그러나, 현재까지 고세균 또는 고히열성세균로부터의 APP의 성질에 대한 보고가 없다.

경제적으로 가치가 있고 열에 극히 안정적인 효소들을 찾는 것을 촉진하고 특히 고온에서 성장하는 고히열성 고세균의 생리에 관한 해답을 찾기 위하여, 본 발명자들은 고히열성 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 아미노펩티다제 P에 속하는 아미노펩티다제 P 유전자를 발견하였고, 상기 유전자를 클로닝하고, 이를 재조합벡터를 이용하여 발현시키고, 정제하여, 효소적 활성을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 신규의 고평열성인 아미노펩티다제 P를 제공하는 것이다.

본 발명은 신규의 고평열성인 아미노펩티다제 P를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성

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

본 발명은 아미노펩티다제 P를 암호화하는 분리된 DNA 서열 및 이들을 함유하는 재조합 벡터를 제공한다.

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

"등가의 핵산서열"에는 상기 아미노펩티다제 P 효소 서열의 코돈 축퇴성 서열을 포함한다.

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

제 2 양태로, 본 발명은 아미노펩티다제 P를 제공한다. 보다 상세하게는 서열번호 6로 표시되는 아미노펩티다제 P 및 이의 기능적 동등물을 제공한다.

본 발명의 "기능적 동등물"에는 서열번호 2의 아미노펩티다제 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 아미노펩티다제 P의 활성에 직접 관여하지 않는 부분에 위치한다.

본 발명은, 제 3 양태로는 상기 아미노펩티다제 P를 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 아미노펩티다제 P를 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 아미노펩티다제 P를 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] 아미노 펩티다아제 P (APP) 유전자의 일차 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 700ml를 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 DH5a가 플라스미드 증식 및 핵산 서열분석을 위해 사용되었다. *E. coli* BL21-Codonplus(DE3)-RIL 세포(스트라 타진, 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 샘플 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) APP-암호화 유전자의 클로닝 및 발현

NdeI 및 *XhoI*에 의해 플랭크(f flank)된 *Thermococcus* sp. NA1의 APP 유전자의 전장 길이는 게놈 DNA와 두 개의 프라이머(센스 [5'-CGACCCGGCATA7GCGCCTCAACAAGCTCACTTCTCTG-3'; 서열번호 3] 및 안티센스 [5'-CTCCACATCTCGAGCACGATTATCAGCTCCCTCGGTGCC-3'; 서열번호 4]; 상기 센스 프라이머 안에 이탤릭로된 서열이 *NdeI* 사이트이고, 안티센스 프라이머 안에 이탤릭체로 된 서열이 *XhoI*이다)를 이용하여 증폭되었다. 증폭되어진 서열은 *NdeI* 및 *XhoI*로 다이제스트되었고, *NdeI/XhoI* 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. APP 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, APP는 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 완충용액교환이 되어졌다.

단백질 농도는 33,710 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) APP 유전자의 일차 구조 및 재조합 효소의 발현

본 발명의 발명자들은 70-90°C의 높은 온도에서 성장하는 고호열성 고세균 *Thermococcus* sp. NA1을 분리하였다. 게놈 염기서열을 분석함으로써, 본 발명의 발명자들은 356 아미노산으로 구성되며 예측분자량이 39,714 Da 인 단백질을 암호화하는 1,071 bp로 구성되는 본 발명의 오픈 리딩 프레임(ORF)을 발견하였다.

염기서열 비교분석은 *T. kodakaraensis* KOD1 (75% 동일성) (5), *Pyrococcus abyssi* GE5 (74% 동일성)의 추정적 APP 유전자 및 *Pyrococcus horikoshii* OT3의 디펩티다제(74% 동일성)와 본 발명의 단백질의 높은 유사성을 보여준다(도 1). 아미노산 서열분석은, *E. coli* APP의 결정구조에서 금속 이온 배위에 관련된 활성 부위 잔기들로 모두 처음 확인된, 두 개의 아스파르트산 잔기, 한 개의 히스티딘 잔기 및 두 개의 글루탐산 잔기가 TNA1_APP에서 완벽하게 보존된다는 것을 보여준다(도 14).

두 개의 다른 결정적인 잔기들도 또한 모두 높은 비율로 보존된다; 이러한 두 개의 히스티딘은 용매로 양성자를 교환하는 역할을 할 것으로 추정된다. 상기한 분석에 기초해 볼 때 오픈 리딩 프레임(ORF)은 APP인 것으로 추정되나, 다른 모든 고세균의 APP가 추정된 것으로 기재되고 있기 때문에 이러한 사실을 효소 활성을 밝힘으로써 재확인하는 것이 필요하였다.

이것을 확인하기 위하여, APP 유전자를 PCR 기법을 사용하여 증폭하였고, 발견된 효소를 가용성의 세포 추출물로부터 상기한 방법에 의하여 정제하였다.

SDS-PAGE에 의한 분석은, C-말단에서 LEH₆-(His-태그)에 상응하는 1-kDa 펩타이드 및 40-kDa APP 단백질로 구성된 용합물의 기대된 크기인, 41-kDa 단백질이 본 발명의 정제된 시료의 주요 구성요소라는 것을 보여준다(도 2).

[실시예 2] 아미노펩티다아제 P 효소의 생화학적 특성 규명

(1) 효소 분석

Lys(N-Abz)-Pro-Pro-pNA(Bachem AG, Bubendorf, Switzerland)의 APP-촉매 가수분해는 Lys(N-Abz)-OH의 방출에 의해서 관측되었다. 이것은 F-2000 형광분광기(Hitachi, 도쿄, 일본)을 이용하여 80°C에서 417nm의 방출파장 및 320nm의 흥분파장에서 관측되었다. 반응물 혼합액(1ml)은 50mM의 소듐 아세테이트 완충용액(PH 5.0), 15 μM Lys(N-Abz)-Pro-Pro-pNA 및 1.2 mM의 CoCl₂ 로 구성되었다. 반응은 2μg의 APP를 첨가함으로써 시작되었다. Met-Pro(Bachem AG, 부벤도르프) 디펩티드의 가수분해로부터 떨어져 나오는 프롤린의 양에 기초한 분석방법이 일반적으로 사용되었다. 프롤린 농도는 아론 및 밀이나르에 의한 비색 닐하이드린 방법의 변형에 의하여 측정하였다. 닐하이드린제가 60%(v/v) 빙초산 및 40%(v/v)의 인산에 3%(w/v)의 닐하이드린을 첨가하고, 70°C에서 30분간 항온보관하여 제조되었다. 50mM 소듐 아세트산 완충용액(pH 5.0), 4mM의 Met-Pro, 및 1.2mM CoCl₂를 포함하는 APP 분석 혼합액(300μl)이 5분동안 80°C에서 항온보관되었다. 반응은 효소의 첨가로 시작되었고, 혼합액은 추가의 5분동안 80°C에서 항온반응되었다. 그리고 반응은 빙초산(300μl)을 첨가함으로써 종결되었고, 닐하이드린제(300 μl)가 첨가되었다. 10분동안 80°C에서 가열된 후, 반응물은 얼음에서 식혀졌고, 515nm에서의 흡광도가 측정되었다. 방출되어진 프롤린의 양은 닐하이드린-프롤린 복합체에 대한 4,579 M⁻¹cm⁻¹의 몰 흡광 계수를 이용하여 계산되었다. APP 1 단위는 상기 분석 조건에서 분당 1μmole의 프롤린을 방출하는 효소의 양이다.

(2) APP 효소의 생화학적 특성규명

본 발명의 정제된 단백질을 전형적인 APP 기질에 대하여 그 활성을 실험하였으며, 이것은 Lys(N^ε-Abz)-Pro-Pro-pNA를 가수분해하는 것에 의하여 APP 활성을 보여준다. APP는 비록 많은 경우에 있어서 C-말단 부위에서 프롤린을 갖는 디펩티드를 가수분해할 수는 없지만, 말단에서 두번째 잔기가 프롤린인 펩타이드로부터 N-말단 아미노산을 특이적으로 제거하는 단백질분해효소이다.

본 발명의 재조합 효소가 디펩티드 및 Lys(N^ε-Abz)-Pro-Pro-pNA를 가수분해할 수 있는지를 보기 위하여, Met-Pro에 대한 가수분해활성도를 실험하였다. 본 발명의 재조합 효소는 Met-Pro 디펩티드를 명백하게 가수분해할 수 있었다.

도 3A에 나타난 바 대로, Met-Pro에 대한 APP 활성은 높은 온도에서 강하게 촉진되었고, 100°C 이상에서 최적활성온도를 보여주었고, 40-50°C에서 관찰된 최대활성보다 10% 적은 정도이었다. 동일한 경향이 Lys(N^ε-Abz)-Pro-Pro-pNA

와의 실험에서 또한 나타나고 있다. APP 활성에 대한 pH의 영향은 pH 범위 4-8에서 다양한 완충용액을 이용하여 측정하였다. 흥미롭게도, APP 활성의 최적 pH는 Met-Pro (도 3B) 및 Lys(N^ε-Abz)-Pro-Pro-pNA (도 3C) 에 대하여, 각각 pH값 5 및 6.5-7로 다르게 나타났다.

열 안정성은 본 발명의 효소를 50 mM 소듐 아세테이트 완충용액, pH 5, 80 및 90°C에서 배양함으로 측정하였다. APP는 열에 매우 안정적으로써, 효소활성 반감기가 80°C에서 100분 이상이었고 90°C 이상에서 49분 이상이었다(도 4). 흥미롭게도, 80°C에서 항온보관된 APP는 상대적인 활성이 20분내에 20%까지 증가하는 것으로 나타났다(도 4의 삽입도면).

금속 결합을 위한 보존된 아미노산 잔기의 존재는 TNA1_APP가 금속이온의 첨가에 의해 영향을 받을 수도 있다는 것을 암시한다. 도 5에 나타난바 대로, 본 발명의 투석여과된 효소에 대한 Co²⁺ 이온의 첨가는 그 효소활성을 25배 증가시켰으며, Mn²⁺ 및 Zn²⁺ 은 활성을 각각 5배 및 4배 증가시켰다. 이러한 이온들은 다른 2가 양이온들로 교체될 수 없었다(Ba²⁺, Ca²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Mg²⁺ 및 Ni²⁺). APP 활성에 대한 Co²⁺, Mn²⁺ 및 Zn²⁺ 농도의 효과는 3 mM CoCl₂, 20 mM MnCl₂ 및 0.4 mM ZnCl₂ 에서 최대활성을 보여 매우 다른 반응을 보여 주었다. 그러나, 이러한 양이온들은 그들의 최적농도 이상으로 첨가되었을 때 억제 현상을 야기하였다. 반응속도분석은 Met-Pro를 사용하여 수행하였고, K_m (0.96 mM), V_{max} (796 μmol min⁻¹ mg⁻¹) 및 k_{cat} (541 s⁻¹) 같은 반응속도 상수는 측정된 활성으로부터 계산하였다(도 6).

본 발명의 금속-APP 유전자는 염기서열 분석을 통하여 동일성을 확인하였고, 예측되는 기능은 *E. coli*에서 발현된 재조합 효소의 생화학적 특성규명을 통하여 재확인하였다. 데이터베이스 분석은 TNA1_APP의 아미노산 서열이 각각 고세균 *T. kodakaraensis* KOD1, *P. abyssi* GE5 및 *P. horikoshii* OT3의 계놈 염기서열에서의 두 개의 추정적 APP 및 한 개의 추정적 디펩티다아제와 매우 밀접한 관계가 있다는 것을 보여준다.

그것은 또한 고세균 *Sulfolobus tokodaii* str. 7 (39%) 및 *E. coli* O157 (26%)의 APP 및 *Drosophila melanogaster* (17%), 인간 (19%), 쥐(21%) 및 *Caenorhabditis elegans* (20%)의 세포질 APP와의 유사성을 보여준다. 결론적으로, 본 발명의 정제된 효소는 Met-Pro 및 Lys(N^ε-Abz)-Pro-Pro-pNA 의 가수분해에 의해 예측되는 것처럼 APP 활성을 나타낸다. 중온성의 근원으로부터의 모든 다른 APP는 최대 55°C의 온도에서 최적활성을 나타낸다.

T. kodakaraensis KOD1의 세포의 분획으로부터 정제된 열에 안정적인 티올 프로테아제(TT protease)를 제외하고, *Thermococcus* spp.로부터 분리된 대부분의 프로테아제 및 펩티다아제가 보통의 높은 온도인 70-85°C에서 증가된 활성을 갖는다는 것을 고려할 때, TNA1_APP가 100°C 이상에서 최적 온도를 나타낸다는 것은 놀라운 일이다. TNA1_APP가 열에 극히 안정적인 효소라는 사실은 이 효소가 80°C에서 t_{1/2} 이 100 분 이상이라는 것에 의해 증명된다.

더 나아가 TNA1_APP가 높은 온도에서의 항온보관에 의하여 상당히 활성화 되는 것처럼 나타난다. 짧은 시간 동안의 열에 의해 야기된 활성화는 아실아미노산-방출 효소, 세포내 프로테아제, 프롤릴 엔도펩티다제 및 카르복시펩티다아제를 포함하여 *P. horikoshii*, *Sulfolobus solfataricus* 또는 *Thermococcus* sp. NA1로부터 정제된 다른 단백질 분해 효소에서 또한 관찰되었다. 비록 그 메커니즘은 연구되지 않았지만, 본 발명의 효소에서 열에 의한 형태변화가 그 활성을 증가시킨 것으로 추측된다.

구아글리아르디(Guagliardi) 등은 전-열처리에 의한 활성의 증가가 호열성 생물원으로부터의 몇몇 효소의 특징이며, 그리고 이것은 보통 온도에서 이러한 효소들이 채용한 낮은 활성 상태의 활성화를 반영하는 것이라고 본다.

TNA1_APP의 최적 pH는 다른 APP와 구별되는 약산성 범위 내에(pH 5, 6.5-7) 있다. 비록 소의 폐에서 분리된 막결합 APP가 브라디키닌(bradykinin) 가수분해에서 6.5의 최적 pH를 보여주고 있으나, 대부분의 APP는 pH 7-9에서 최적 활성을 나타낸다.

더 나아가, 최적 pH값은 Met-Pro 및 Lys(N^ε-Abz)-Pro-Pro-pNA 의 가수분해에서 다르게 나타났다.

*Lactococcus lactis*로부터의 효소 및 다른 근원으로부터의 효소들처럼, *Thermococcus* sp. NA1로부터의 APP는 Co²⁺ 및 Mn²⁺에 의해 자극을 받는 금속효소이다.

Zn²⁺ 또한 자극 효과를 보였는데, 이것은 모든 포유동물 및 *C. elegans* 의 APP의 Zn²⁺ 억제와 반대된다.

발명의 효과

본 발명에 따른 단백질 분해 효소는 고호열성인 신규한 단백질 분해효소들이다.

아미노펩티다제 P는 포유류에서 콜라겐의 단백질 재편성 및 물질 P 및 브라디키닌(bradykinin) 같은 생물학적으로 활성이 있는 펩타이드의 조절에 관련이 있다. 상당수의 lactococcal 균주들로 부터의 APP는 펩타이드를 분해하여 이를 치즈 기질에 방출하는데 관여함으로써 치즈의 성숙과정에서 쓴맛을 없애는데 기여하는 것으로 보고되고 있다

참고문헌

1. Chen, K. C., and T. M. Buchanan. 1980. Hydrolases from *Neisseria gonorrhoeae*. The study of gonococsin, an aminopeptidase-P, a proline iminopeptidase, and an asparaginase. *J. Biol. Chem.* 255:1704-1710.
2. Cohen, G. N., V. Barbe, D. Flament, M. Galperin, R. Heilig, O. Lecompte, O. Poch, D. Prieur, J. Querellou, R. Ripp, J. C. Thierry, J. Van der Oost, J. Weissenbach, Y. Zivanovic, and P. Forterre. 2003. An integrated analysis of the genome of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Mol. Microbiol.* 47:1495-1512.
3. Cottrell, G. S., N. M. Hooper, and A. J. Turner. 2000. Cloning, expression, and characterization of human cytosolic aminopeptidase P: a single manganese(II)-dependent enzyme. *Biochemistry* 39:15121-15128.
4. Cunningham, D. F., and B. O'Connor. 1997. Proline specific peptidases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1343:160-186.
5. Fukui, T., H. Atomi, T. Kanai, R. Matsumi, S. Fujiwara, and T. Imanaka. 2005. Complete genome sequence of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 and comparison with *Pyrococcus* genomes. *Genome Res.* 15:352-363.
6. Guagliardi, A., L. Cerchia, and M. Rossi. 2002. An intracellular protease of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus*, which has sequence similarity to eukaryotic peptidases of the CD clan. *Biochem. J.* 368:357-363.
7. Harbeck, H.-T., and R. Mentlein. 1991. Aminopeptidase P from rat brain. Purification and action on bioactive peptides. *Eur. J. Biochem.* 198:451-458.
8. Hooper, N. M., J. Hryszko, and A. J. Turner. 1990. Purification and characterization of pig kidney aminopeptidase P. A glycosyl-phosphatidylinositol-anchored ectoenzyme. *Biochem. J.* 267:509-515.
9. Ishikawa, K., H. Ishida, Y. Koyama, Y. Kawarabayasi, J. Kawahara, E. Matsui, and I. Matsui. 1998. Acylamino acid-releasing enzyme from the thermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*. *J. Biol. Chem.* 273:17726-17731.
10. Kawarabayasi, Y., M. Sawada, H. Horikawa, Y. Haikawa, Y. Hino, S. Yamamoto, M. Sekine, S. Baba, H. Kosugi, A. Hosoyama, Y. Nagai, M. Sakai, K. Ogura, R. Otsuka, H. Nakazawa, M. Takamiya, Y. Ohfuku, T. Funahashi, T. Tanaka, Y. Kudoh, J. Yamazaki, N. Kushida, A. Oguchi, K. Aoki, and H. Kikuchi. 1998. Complete sequence and gene organization of the genome of a hyper-thermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus horikoshii* OT3. *DNA Res.* 30:55-76.
11. Kulkarni, G. V., and D. D. Deobagkar. 2002. A cytosolic form of aminopeptidase P from *Drosophila melanogaster*: molecular cloning and characterization. *J. Biochem.* 131:445-452.
12. Laurent, V., D. R. Brooks, D. Coates, and R. E. Isaac. 2001. Functional expression and characterization of the cytoplasmic aminopeptidase P of *Caenorhabditis elegans*. *Eur. J. Biochem.* 268:5430-5438.

13. Mars, I., and V. Monnet. 1995. An aminopeptidase P from *Lactococcus lactis* with original specificity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1243:209-215.
14. Mc Donnell, M., R. Fitzgerald, I. N., Fhaolain, P. V. Jennings, and G. O'Cuinn. 1997. Purification and characterization of aminopeptidase P from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *J. Dairy Res.* 64:399-407.
15. Morikawa, M., Y. Izawa, N. Rashid, T. Hoaki, and T. Imanaka. 1994. Purification and characterization of a thermostable thiol protease from a newly isolated hyperthermophilic *Pyrococcus* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:4559-4566.
16. Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
17. Simmons, W. H., and A. T. Orawski. 1992. Membrane-bound aminopeptidase P from bovine lung. Its purification, properties, and degradation of bradykinin. *J. Biol. Chem.* 267:4897-4903.
18. Taylor, I. N., R. C. Brown, M. Bycroft, G. King, J. A. Littlechild, M. C. Lloyd, C. Praquin, H. S. Toogood, and S. J. C. Taylor. 2004. Application of thermophilic enzymes in commercial biotransformation processes. *Biochem. Soc. Transact.* 32:290-293.
19. Wilce, M. C., C. S. Bond, N. E. Dixon, H. C. Freeman, J. M. Guss, P. E. Lilley, and J. A. Wilce. 1998. Structure and mechanism of a proline-specific aminopeptidase from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:3472-3477.
20. Yaron, A., and D. Mlynar. 1968. Aminopeptidase-P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 32:658-663.
21. Yaron, A., and F. Naider. 1993. Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol.* 28:31-81
22. Yoshimoto, T., A. T. Orawski, and W. H. Simmons. 1994. Substrate specificity of aminopeptidase P from *Escherichia coli*: comparison with membrane-bound forms from rat and bovine lung. *Arch. Biochem. Biophys.* 311:28-34.
23. Yoshimoto, T., N. Murayama, and D. Tsuru. 1988. A novel assay method for aminopeptidase P and partial purification of two types of the enzyme in *Escherichia coli*. *Agric. Biol. Chem.* 52:1957-1963.

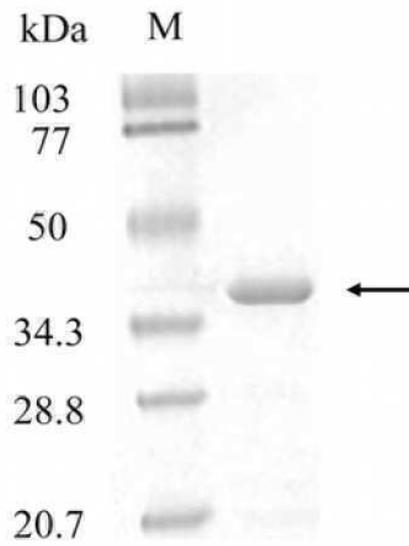
도면의 간단한 설명

도 1은 *Thermococcus* sp. NA1 (TNA1), *T. kodakarensis* KOD1 (TkKOD1, gi: 57641390) 및 *P. abyssi* GE5 (PaGE5, gi:14521082)로부터의 아미노펩티다아제 P 및 *P. horikoshii* OT3 (PhOT3, gi:14590819)로부터의 디펩티다아제의 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. 금속 이온 배위결합 및 양성자 교환에 참여하는 추정적 활성 지점 잔기는 각각 굵은 문자 및 밑줄로 표시하였다.

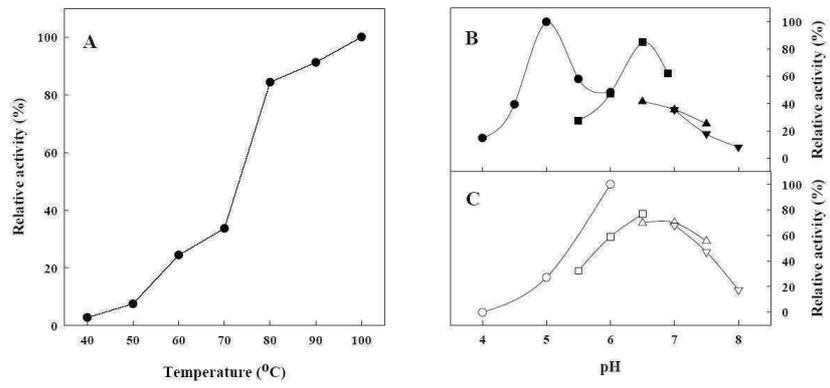
도 2는 정제된 효소의 SDS-PAGE (12%)의 결과를 나타낸다. M 레인의 분자량 스탠다드는 포스포릴라제 b (phosphorylase b; 103 kDa), 소 혈청 알부민(bovine serum albumin; 77 kDa), 오발부민(ovalbumin; 50 kDa), 카보닉 안하이드라제(carbonic anhydrase; 34.3 kDa), 콩 트립신 억제제(soybean trypsin inhibitor; 28.8 kDa) 및 리소자임(lysozyme; 20.7 kDa) 이다. 본 발명의 효소에 상응하는 밴드는 화살표로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

도 3은 아미노펩티다아제 P(TNA1_APP)의 활성에 대한 온도(A) 및 pH (B, C)의 효과를 나타낸다. A: 시료온도를 40에서 100°C 까지 증가시키며, 표준상태에서 활성분석을 수행하였다. B, C: 소듐 아세트산 (동그라미), pH 4-6; KMES (네

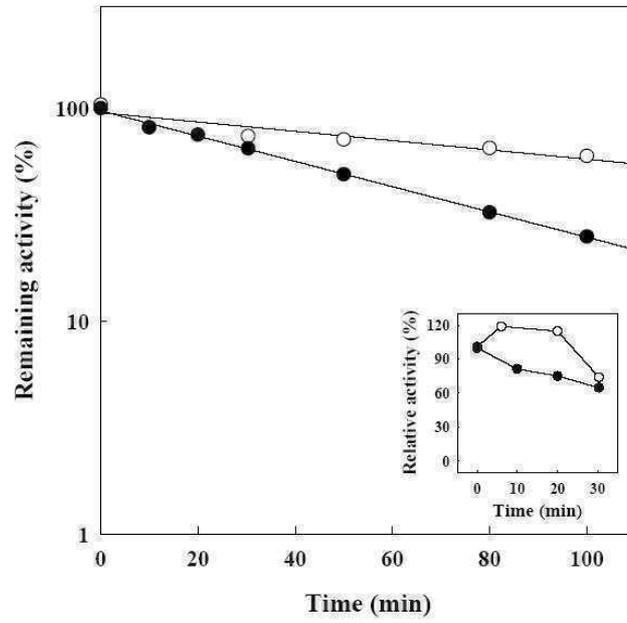
도면2



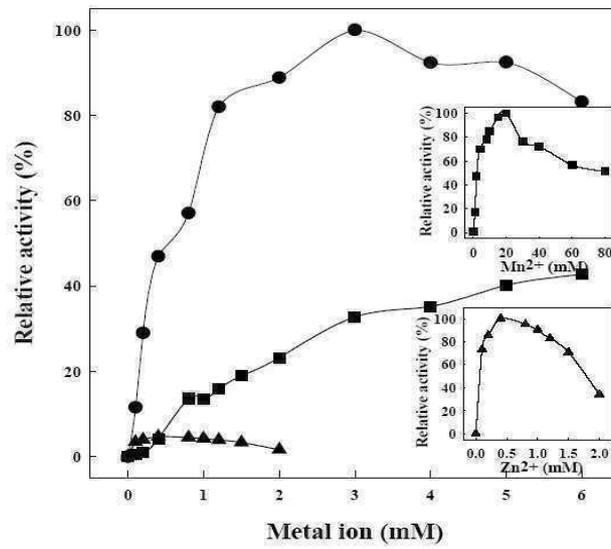
도면3



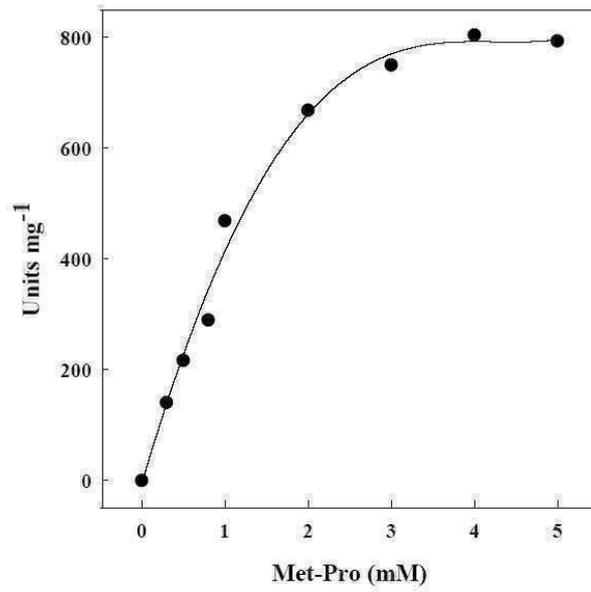
도면4



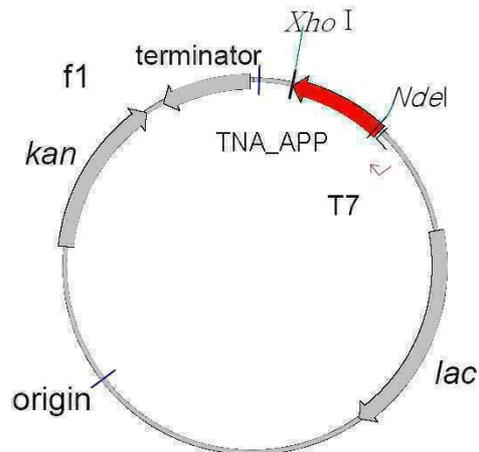
도면5



도면6



도면7



서열목록

- <110> KOREA OCEAN RESEARCH AND DEVELOPMENT INSTITUTE
- <120> Hyperthermophilic Aminopeptidase P and Methods of Preparation Thereof
- <160> 4
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 1071
- <212> DNA

<213> Thermococcus sp.

<400> 1

atgcgctca acaagctcac ttctctgctc aaggaaaaag ccttcgacgg agcgctgata 60
agccccggga cgaacctcta ctacctaacg agcctgcaca tccacgaagc gggagagaga 120
ctaacggttc tagccgtcaa ttcgaacggg gagtaccacc ttttagcgcc aagcctctac 180
gagaacgtca tcagggattt ccctgctacc ttctggcggt atggagagaa tccctacggg 240
aagctcgccg aaatcctaaa ggaactcgac ctatcatctg gcaggatcct tgtggagaac 300
acgatgaggg cagactggct gataggtatt ctcaagcttg gaagcttcga gttccatccg 360
ttaagcattc tgatgcgca gcttagaatg agaaaagacg ctgaggaaat taggctcatg 420
gagaaggcgg caaagatcgt cgatgaggtc ttcgaggaga taatcggcat ggacttaatc 480
ggaatgcgcg agaaagacct tgccctgaaa attgagctcc tcataagga gcgctccgac 540
gggatatcct tcgagccaat agttgccagc ggtgagaatg gggcaaatcc ccaccacggc 600
cccggcgaga ggaaactggg ggaaggagac ctcgttatcc tcgactacgg cgcaaagtgg 660
gaaggctact gctcagacat aacgaggacc attgcgtag gaaagccaga caagaagctt 720
ctggagattt atgaggtcgt caaaaacgcc caggagggcg ccttcagac cgtccgag 780
ggcctaaagg cgaaggaggt tgacaaagcg gcaaggaact acatagcgga agcgggctat 840
ggcgagtact tcaactcacag aactggccat ggacttggct tagacgtcca cgaggagcca 900
tacatcgggc cggacggcga ggtaatcctc aagaacggca tgaccttac gatagagccg 960
ggcatctacg tgccgggctt ggggggagtt agaatagagg acgatgtggt cgttgagggc 1020
ggaaagggaa gaaggttgac gaaggcaccg agggagctga taatcgtgtg a 1071

<210> 2

<211> 356

<212> PRT

<213> Thermococcus sp.

<400> 2

Met Arg Leu Asn Lys Leu Thr Ser Leu Leu Lys Glu Lys Ala Phe Asp
1 5 10 15
Gly Ala Leu Ile Ser Pro Gly Thr Asn Leu Tyr Tyr Leu Thr Ser Leu
20 25 30
His Ile His Glu Ala Gly Glu Arg Leu Thr Val Leu Ala Val Asn Ser

Gly Ile Tyr Val Pro Gly Leu Gly Gly Val Arg Ile Glu Asp Asp Val
 325 330 335

Val Val Glu Gly Gly Lys Gly Arg Arg Leu Thr Lys Ala Pro Arg Glu
 340 345 350

Leu Ile Ile Val
 355

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

<220>
 <223> Aminopeptidase P sense primer

<400> 3
 cgacccggca tatgcgctc aacaagctca cttctctg 38

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

<220>
 <223> Aminopeptidase P antisense primer

<400> 4
 ctccacatct cgagcacgat ttcagctcc ctcggtgcc 39