



(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 10-2007-0046635  
(43) 공개일자 2007년05월03일

(21) 출원번호 10-2005-0103487  
(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 프로릴올리고펩티다아제 효소 및 이의 제조방법

(57) 요약

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

**청구항 6.**

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

**청구항 7.**

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

**청구항 8.**

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

### 청구항 9.

제 1 항에 따른 고히열성 프로틸올리고펩티다아제 효소가 서열번호 2와 기능적으로 동등한 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 프로틸올리고펩티다아제 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 6에 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 프로틸올리고펩티다아제 효소 생산방법.

## 명세서

## 발명의 상세한 설명

### 발명의 목적

#### 발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

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

### 프로틸(prolyl) 올리고펩티다아제

프로틸(Prolyl) 올리고펩티다아제(POP, EC 3.4.21.26)은 프로틸 엔도펩티다아제(prolyl endopeptidase; PEP)라고 불리며, 단백질 잔기의 C-말단에서의 프롤린-포함 펩타이드의 가수분해를 선호하는 효소이다(Wilk 1983). 촉매 트라이어드의 순서의 면에서 볼 때 잘 알려진 트립신 또는 서브틸리신 패밀리와는 관련이 없고, 다른 세린 펩티다아제 분류에 속한다(Clan SC, 패밀리 S9), 이 분류에는 디펩티딜 펩티다아제 IV, 아크릴아미노아킬 펩티다아제, 및 올리고펩티다아제 B가 속한다(Rawlings and Barret 1994; Rawling et al. 1994). 이들 효소는 전체 약 30 아미노산 잔기 이하의 기질을 선택하고 절단하는 방식을 공유하고 있다. 돼지의 POP의 결정 구조 및 이 돌연변이 유도체는  $\alpha/\beta$ -하이드롤라아제 접합의 펩티다아

제 도메인을 가지고 있고, 이것의 촉매 트라이어드(Ser554, Asp641, His680)은 특수한  $\beta$ -프로펠러의 중심 터널에 의해서 덮혀 있었다. 이것은 큰 구조의 펩타이드를 배제시키는 활성부위에 대한 입구 필터로서 작용한다(Fulop et al, 2000; Fulop et al. 2001; Polar 2002; Szeltner 2000).

이 프롤린-특이적 효소는 세균, 고세균, 곰팡이, 동물 및 식물에 넓게 분포되어 있다(Harwood et al. 1997; Kabashima et al. 1998; Rennex et al. 1991; Yoshimoto et al. 1980; Yoshimoto et al. 1991). 여러개의 POP의 분리, 클로닝, 이종 발현이 *Flavobacterium meningosepticum*(Yoshimoto et al. 1980), *Sphingomonas capsulate*(Kabashima et al. 1998), *Aeromonas hydrophila*(Kanatani et al. 1993), 돼지의 뇌(Rennex et al.1991) 및 인간의 T-림프구(Vanhoof et al. 1994)에서 보고되었다. 이것은 건망증(Yoshimoto et al. 1987), 우울증(Maes et al. 1994), 및 알츠하이머 병(Shinoda et al. 1997) 뿐만아니라, 펩타이드 호르몬 및 뉴로펩타이드의 성숙 및 분해(Wilk 1983)에도 관여할 것이다. 이들 POP는 생리적 과정에서 중요할 뿐만아니라, 생화학 및 임상적 적용에서 상당한 잠재성을 가지고 있다(Diefenthal et al. 1993). 대부분의 세린 엔도펩티다아제가 프롤린 잔기를 가수분해하지 못하기 때문에, 프롤린-특이적 단백질 분해효소는 코엘릭 스프루(coeliac sprue) 및 위장간의 소화에 상대적으로 잘 견뎌서, 유전적으로 감수성인 사람에서 면역질환을 일으키도록 장내에 남아있는 밀, 호밀 및 보리로부터의 프롤린-풍부 글루텐의 소화관련 질병에의 치료에서 중요하다(Sollid 2002). 이와 같은 해로운 펩타이드의 POP-촉매 단백질내 분해는 이들의 제거를 촉진하기 위해 제안되었다(Hausch et al. 2002; Shan et al. 2002).

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 프로틸올리고펩티다아제에 속하는 프로틸올리고펩티다아제 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 프로틸올리고펩티다아제를 제공하는 것이다.

본 발명은 신규의 고호열성인 프로틸올리고펩티다아제를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

### 발명의 구성

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

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

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

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

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

제 2 양태로, 본 발명은 프로틸 올리고펩티다아제를 제공한다. 보다 상세하게는 서열번호 2로 표시되는 프로틸 올리고펩티다아제 및 이의 기능적 동등물을 제공한다.

본 발명의 "기능적 동등물"에는 서열번호 2의 프로틸올리고펩티다아제 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 프로틸 올리고펩티다아제의 활성에 직접 관여하지 않는 부분에 위치한다.

본 발명은, 제 3 양태로는 상기 프로틸올리고펩티다아제를 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 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 바람직한 계는 대장균을 이용한다.

본 발명의 제 5 양태로는 상기 형질전환 세포, 또는 상기 *Thermococcus* sp.를 이용하여 프로틸올리고펩티다아제를 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] 프로틸 올리고펩티다아제(TNA1\_POP)의 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) 프로틸 올리고펩티다아제-암호화 유전자의 클로닝 및 발현

*NdeI* 및 *SaI*에 의해 플랭크(flank)된 *Thermococcus* sp. NA1(TNA1\_CP)의 카르복시펩티다아제의 유전자의 전장 길이는 게놈 DNA와 두 개의 프라이머(센스 [[5'-CGACCCGGCATA TGGATGACCCTTACATGTGGATGGAG-3'; 서열번호 3] 및 안티센스 [5'-CTCCACATGTGCAGAGCCTCGAGAGTCTCAACAACAAAC-3'; 서열번호 4]; 상기 센스 프라이머 안에 이탤릭로 된 서열이 *NdeI* 사이트이고, 안티센스 프라이머 안에 이탤릭체로 된 서열이 *SaI*이다)를 이용하여 증폭

되었다. 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 카르복시펩티다아제를 가지고 있음이 확인되었다.

얻어진 플라스미드는 발현을 위해 *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL로 형질전환되었다. 프로틴 올리고펩티다아제 유전자의 과량발현은 이소프로필-β-D-티오갈락토피라노사이드(IPTG)를 중간 기하급수적 성장기에 첨가하고, 37°C에서 3 시간 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, 세인트 루이스, 미주리)로 세척되었고, 프로틴 올리고펩티다아제는 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 112,370 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>의 몰 흡광 계수를 이용하여 280nm에서의 흡광도로부터 측정되었다. 단백질의 정제도는 표준 방법으로 수행되어진 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동(SDS-PAGE) 분석에 의해서 조사되었다.

#### (4) TNA1\_POP의 일차적 구조 및 재조합 효소의 발현

최근에, 발명자들은 고온(70-90°C)에서 자라는 고세균 *Thermococcus sp.* NA1을 분리하였고, 지놈 서열분석을 통하여, 1,851 bp으로 구성되어진 오픈 리딩 프레임을 발견하였고, 이것을 TNA1\_POP이라 명명하였고, *T. kodakarnsis* KOD1 (83% 상동성, Fukui et al. 2005), *P. abyssi* GE5 (79% 상동성, Cohen et al, 2003), *P. horikoshii* OT3 (76% 상동성, Kawarabayashi et al. 1998) 및 *P. furiosus* DSM 3638(76% 상동성, Robb et al. 2001)의 프로틴 올리고펩티다아제에 유사한 단백질을 암호화 하고 있었다(도 1). 암호화된 단백질은 70,380 Da 및 4.98의 PI을 가진 616 아미노산으로 구성되어 있다. 아미노산 서열의 정렬에 기초하여, Ser477, Asp559, 및 His591은 TNA1\_POP의 촉매 잔기로 예상되었다.

TNA1\_POP 유전자는 PCR을 이용하여 증폭되었고, 발현되어진 효소는 용해성 세포 추출물로부터 정제되었다. SDS/PAGE의 분석에 의해 72- kDa의 단백질이 분리된 시료의 주된 성분으로 보였다(도 2). 이것은 70.4 kDa POP 단백질과 단백질의 C- 말단 부분의 -VDKLAAALEH<sub>6</sub>-(His-태그)에 상응하는 1.7 kDa의 결합 생성물의 예상된 크기이다.

#### [실시예 2] 효소의 생화학적 특성연구

##### (1) 효소 활성 분석

TNA1\_POP 활성도는 Suc-Ala-Pro-p-NA(Bachem AG, 부벤도르프, 스위스)의 가수분해를 측정함으로써 분석되었다. 50 mM 트리스-HCl 완충용액에 포함된 분석 혼합물(800μl) 및 1mM 기질이 5분동안 80°C에서 항온보관되었다. 반응은 효소의 첨가에 의해서 시작되었다. 혼합액은 80°C에서 추가 5분동안 항온보관되었다. 그리고 반응은 1M 트리클로로아세트산(100μl)의 추가에 의해서 정지 되었다. 방출된 p-니트로아닐린의 흡광도는 405nm에서 측정되었고, 405nm에서 ε<sub>405 nm</sub>=10,500 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>의 몰 흡광 계수가 효소 활성의 계산에 사용되었다. 프로틴올리고펩티다아제 활성 1단위는 이들 분석 조건에서 분당 1μmole의 p-니트로아닐린을 방출하는 효소 양으로 결정되었다.

##### (2) 효소의 생화학적 특성연구

TNA1\_POP의 기능은 Suc-Ala-Pro-pNA을 가수분해할 수 있는 능력으로부터 확인되었다. 이들 기질은 보통의 분석에 사용되었다. 프로틴올리고펩티다아제의 활성은 고온에서 강하게 촉진되었으며, 80°C에서 최적 활성을 보였으며, 최대활성의 10% 미만의 활성이 30-50°C 및 100°C에서 관찰되었다(도 3). 프로틴 올리고펩티다아제 활성에 대한 pH의 영향은 pH 범위 4-10에서 다른 완충용액을 이용하여 평가되었고, 최적값은 pH 7.5 이었다(도 3).

100분까지 50mM 트리스-HCl 완충용액(pH 7.5)안에서 80°C 및 90°C에서 항온배양한 후, 열안정성 및 열 활성화를 결정하기 위하여 80°C에서 TNA1\_POP의 상대적인 활성을 측정하였다. 상대적인 활성은 각각 80°C 및 90°C에서 10 분 및 6분

항온반응한 후 거의 6배 증가하는 것으로 보였다(도 4a). 짧은 시간내에 열처리에 의한 효소의 활성화는 *P. furiosus* POP (Harwood et al. 1997), *P. horkkoshii*로부터의 아킬아미노산-방출 효소(Ishikawa et al. 1998), *Sulfolobus solfataricus*로부터의 세포내 단백질 분해효소(Guagliardi et al. 2002) 및 *Thermococcus* sp. NA1으로부터의 아미노펩티다아제같은 다른 단백질 분해효소와 함께 관찰되었다. 90°C에서의 긴 항온보관에 의해서, TNA1\_POP은 반감기( $t_{1/2}$ ) 221분으로 활성을 잃어버렸다(도 4b). TNA1\_POP의 불활성화 비율은 95°C에서 24시간 후에는 초기의 POP 활성의 24% 미만인 *P. furiosus* 프로틸 올리고펩티다아제(Harwood et al. 1997)의 것과 매우 비슷하였다. 하아우드(Harwood) 등은 고온에서 관찰되는 *P. furiosus* 프로틸 올리고펩티다아제의 불활성화는 고농도에서 자가분해에 많은 부분 기원할 것이라고 설명하였다. 실제로 TNA1\_POP는 열안정성 실험에서 사용한 *P. furiosus* POP의 것보다 70배 적은 매우 낮은 농도(1.25 µg/ml)로 사용되었고, *P. furiosus*의 희석된 효소 조제물(5.4 µg/ml)은 매우 안정하였고, 95°C에서 20 시간 후의 초기 활성도의 약 80%를 유지하였다. TNA1\_POP이 고농도에서 자가 분해 되는 지에 대해서는 테스트되지 않았다. TNA1\_POP 및 *P. furiosus* 프로틸 올리고펩티다아제 성분에서 단 하나의 프롤린 차이가 있었고, 매치되지 않는 3개의 프롤린이 있었다: 각각 Pro168에 대한 Ala168에서, Ala242에 대한 Pro242 및 Pro545에 대한 Glu545.

표 1은 TNA1\_POP의 활성이  $Zn^{2+}$  및  $Cu^{2+}$ 에 의해 강하게 억제되는 것을 보이고,  $Co^{2+}$  및  $Ni^{2+}$ 에 의해서 약간 억제 받는 것을 보인다.

[표 1] TNA\_POP에 대한 금속이온 및 EDTA의 효과

금속이온 또는 EDTA 1mM	상대적 활성화도(%)
$Ba^{2+}$	133.5
$Ca^{2+}$	133.8
$Co^{2+}$	46.2
$Cu^{2+}$	16.7
$Mg^{2+}$	128.7
$Mn^{2+}$	98.3
$Ni^{2+}$	46.5
$Zn^{2+}$	3.4
EDTA	145.7
Control	100.0

$Ba^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  및  $Mg^{2+}$ 에 의한 증가된 활성은 사용되어진 시료가 모든 금속이온이 제거되도록 적절하게 교환되지 않았고, 그래서 EDTA-처리된 시료에서는 그 정도로 활성의 증가가 일어난 것이라고 설명되어질 수 있다.

동력학적 분석은 Suc-Ala-Pro-pNA을 이용하여 수행되었고,  $K_m$ (0.4 mM),  $V_{max}$ (18.4 µmole/분/mg) 및  $k_{cat}$  (22.5 S<sup>-1</sup>) 값이 측정된 활성도로부터 계산되었다(도 5). 효소활성은 *F. meningosepticum*, *Sphingomonas capsulate* 및 *Myxococcus xanthus* (Shan et al, 2004)로부터의 세균의 POP의 것들과 비교할 정도의 Suc-Ala-Pro-pNA에 대한 활성도를 보였다. *Thermococcus* sp. NA1로부터의 프로틸 올리고펩티다아제는 세균의 프로틸 올리고펩티다아제보다 낮은  $K_m$  및  $k_{cat}$ 을 가졌다. Suc-Ala-Pro-pNA의 가수분해에 대한  $k_{cat}$  값은 다양한 프롤린-함유 올리고펩타이드에 대한 램의 뇌 프로틸 올리고펩티다아제, 양 신장 프로틸 올리고펩티다아제, 및 *P. furiosus* 프로틸 올리고펩티다아제의 것들과 비교할 만한 것이었다(Harris et al. 2001; Polgar 1991; Walter 및 Yoshimoto 1978; Yoshimoto et al. 1983).

### (3) 특성분석

본 발명자들은 *T. kodakarensis* KOD1, *P. abyssi* GE5, *P. furiosus* DSM 3638 및 *P. horikoshii* OT3에 강하게 연관되어 있는 프로틸 올리고펩티다아제를 암호화하고 있는 *Thermococcus* sp. NA1 유전자를 서열분석 및 기능적 발현을 통해 발견하였다. 데이터베이스 검색은 *Thermococcus* sp. NA1으로부터의 프로틸 올리고펩티다아제의 아미노산 서열은 *Flavobacterium meningosepticum* (27%)(Yoshimoto et. al. 1991) 및 돼지의 뇌로부터의 포유류 프로틸 올리고펩티다아제 (29%) (Rennex et al. 1991) 및 인간의 T 림프구 (29%)로부터의 프로틸 올리고펩티다아제와 서열이 비교되었을 때 낮은 동일성을 보였다. 비록 이들 효소간의 전체적인 유사성은 낮은 편이지만, 촉매 트라이어드 잔기를 가지고 있는 C-말단에서는 높은 보존이 있었다.

활성에 대한 pH 프로파일은 간단하지 않았다. 이것은 이중의 중-모양 커브 같았고, 두개의 pH-의존성 효소 형태에 상응하는 것처럼 보였다. 높은 pH 형태가 더 활성적이었고, 이것은 돼지의 프로틸 올리고펩티다아제 및 *P. furiosus* 프로틸 올리고펩티다아제의 양 프로파일에서 또한 관찰되었다. 반면에, 상기 효소의 *F. meningosepticum* 및 버섯의 최적 pH는 각각 6.5 및 6.8이었다(Kreig and Wolf 1995; Yoshimoto et al. 1988). 해리스(Harris) 등은(2001) 열안정성 프로틸 올리고펩티다아제의 pH 활성화와 관련된 이중 만곡모양의 특징은 ~4.5의  $pK_a$ 를 가진 기능성 그룹(아마도 *P. furiosus* 프로틸 올리고펩티다아제의 카르복실 그룹)의 이온화로부터 기원할 것이라고 주장했다.

효소활성은 EDTA, 메탈 킬레이터에 의해 억제받지 않기 때문에, TNA1\_POP은 금속계열 단백질분해효소 아닌 것으로 보인다. 효소활성에 대한 다른 금속이온의 영향 연구를 통해, 발명자들은 TNA1\_POP가  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  및  $Zn^{2+}$ 에 의해 억제 받았다.

### 발명의 효과

본 발명에 따른 단백질 분해 효소는 고호열성인 신규한 단백질 분해효소들이다.

프로틸(Prolyl) 올리고펩티다아제는 생리적 과정에서 중요할 뿐만 아니라, 생화학 및 임상적 적용에서 상당한 잠재성을 가지고 있다(Diefenthal et al. 1993). 대부분의 세린 엔도펩티다아제가 프롤린 잔기를 가수분해하지 못하기 때문에, 프롤린-특이적 단백질 분해효소는 코엘릭 스프루(coeliac sprue) 및 위장간의 소화에 상대적으로 잘 견디서, 유전적으로 감수성인 사람에서 면역질환을 일으키도록 장내에 남아있는 밀, 호밀 및 보리로부터의 프롤린-풍부 글루텐의 소화관련 질병에의 치료에서 중요하다(Sollid 2002). 이와 같은 해로운 펩타이드의 POP-촉매 단백질내 분해는 이들의 제거를 촉진하기에 유용하다.

프로릴 올리고펩티다아제 관련 참고문헌

Chen Y.-S., J.E. Christensen, J.R. Broadbent and J.L. Steele 2003. Identification and Characterization of *Lactobacillus helveticus* Pep02, an Endopeptidase with Post-Proline Specificity. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1276-1282.

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.

Diefenthal, T., H. Dargatz, V. Witte, G. Reipen and I. Svendsen 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.

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.

Fulop, V., Z. Szeltner and L. Polgár 2000. Catalysis of serine oligopeptidases is controlled by a gating filter mechanism. EMBO Rep. 1:277-281.

Fulop, V., Z. Szeltner, V. Renner and L. Polgár 2001. Structures of prolyl oligopeptidase substrate/inhibitor complexes. Use of inhibitor binding for titration of the catalytic histidine residue. J. Biol. Chem. 276:1262-1266.

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.

Harris, M.N., J.D. Madura, L.J. Ming and V.J. Harwood 2001. Kinetic and mechanistic studies of prolyl oligopeptidase from the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*. J. Biol. Chem. 276:19310-19317.

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

Hausch, F., L. Shan, N.A. Santiago, G.M. Gray and C. Khosla 2002. Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol. 283:G996-G1003.

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.

Kabashima, T., M. Fujii, Y. Meng, K. Ito and T. Yoshimoto 1998. Prolyl endopeptidase from *Sphingomonas capsulata*: isolation and characterization of the enzyme and nucleotide sequence of the gene. Arch. Biochem. Biophys. 358:141-148.

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

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.

Krieg, F. and N. Wolf 1995. Enzymatic peptide synthesis by the recombinant proline-specific endopeptidase from *Flavobacterium meningosepticum* and its mutationally altered Cys-556 variant. Appl. Microbiol. Biotechnol. 42:844-852.

Maes, M., F. Goossens, S. Scharpe, H.Y. Meltzer, P. D'Hondt and P. Cosyns 1994. Lower serum prolyl endopeptidase enzyme activity in major

depression: further evidence that peptidases play a role in the pathophysiology of depression. *Biol. Psychiatry* 35:545-552.

Polgár, L. 1991. pH-dependent mechanism in the catalysis of prolyl endopeptidase from pig muscle. *Eur. J. Biochem.* 197:441-447. Polgár, L. 2002. The prolyl oligopeptidase family. *Cell Mol. Life Sci.* 59:349-362.

Quinto, B.M., M.A. Juliano, I. Hirata, A.K. Carmona, L. Juliano and D.E. Casarini 2000. Characterization of a prolyl endopeptidase (kininase) from human urine using fluorogenic quenched substrates. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32:1161-1172.

Rawlings, N.D. and A.J. Barrett 1994. Families of serine peptidases. *Methods Enzymol.* 244:19-61.

Rawlings, N.D., L. Polgár and A.J. Barrett 1994. A new family of serine-type peptidases related to prolyl oligopeptidase. *Biochem. J.* 279:907-911.

Rennex, D., B.A. Hemmings, J. Hofsteenge and S.R. Stone 1991. cDNA

cloning of porcine brain prolyl endopeptidase and identification of the active-site seryl residue. *Biochemistry* 30:2195-2203.

Robb, F.T., D.L. Maeder, J.R. Brown, J. DiRuggiero, M.D. Stump, R.K. Yeh, R.B. Weiss and D.M. Dunn 2001. Genomic sequence of hyperthermophile, *Pyrococcus furiosus*: implications for physiology and enzymology. *Meth. Enzymol.* 330:134-157.

Sambrook, J. and D.W. Russell 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Schoenlein, C., J. Heins and A. Barth 1990. Purification and characterization of prolyl endopeptidase from pig brain. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 371:1159-1164.

Shan, L., T. Marti, L.M. Sollid, G.M. Gray and C. Khosla 2004. Comparative biochemical analysis of three bacterial prolyl endopeptidases: implications for coeliac sprue. *Biochem. J.* 383:311-318. Shan, L., O. Molberg, I. Parrot, F. Hausch, F. Filiz, G.M. Gray, L.M. Sollid and C. Khosla 2002. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*

297:2275-2279.

Shinoda, M., K. Toide, I. Ohsawa and S. Kohsaka 1997. Specific inhibitor for prolyl endopeptidase suppresses the generation of amyloid beta protein in NG108-15 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235:641-645.

Shirasawa, Y., T. Osawa and A. Hirashima 1994. Molecular cloning and characterization of prolyl endopeptidase from human T cells. *J. Biochem.* 115:724-729.

Sollid, L.M. 2002. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat. Rev. Immunol.* 2:647-655.

Szeltner, Z., V. Renner and L. Polgár 2000. The noncatalytic  $\beta$ -propeller domain of prolyl oligopeptidase enhances the catalytic capability of the peptidase domain. *J. Biol. Chem.* 275:15000-15005.

Vanhoof, G., F. Goossens, L. Hendriks, I. De Meester, D. Hendriks, G. Vriend, C. Van Broeckhoven and S. Scharpe 1994. Cloning and sequence analysis of the gene encoding human lymphocyte prolyl endopeptidase. *Gene* 149:363-366.

Walter, R. and T. Yoshimoto 1978. Postproline cleaving enzyme: kinetic studies of size and stereospecificity of its active site. *Biochemistry* 17:4139-4144.

Wilk, S. 1983. Prolyl endopeptidase. *Life Sci.* 33:2149-2157.

Yokosawa, H., M. Miyata, H. Sawada and S. Ishii 1983. Isolation and characterization of a post-proline cleaving enzyme and its inhibitor from sperm of the ascidian, *Halocynthia roretzi*. *J. Biochem.* 94:1067-1076.

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

Yoshimoto, T., A. Kanatani, T. Shimoda, T. Inaoka, T. Kokubo and D. Tsuru 1991. Prolyl endopeptidase from *Flavobacterium meningosepticum*: cloning and sequencing of the enzyme gene. *J. Biochem. (Tokyo)* 110:873-878.

Yoshimoto, T., K. Miyazaki, N. Haraguchi, A. Kitazono, T. Kabashima and K. Ito 1997. Cloning and expression of the cDNA encoding prolyl

oligopeptidase (prolyl endopeptidase) from bovine brain. Biol. Pharm. Bull. 20:1047-1050.

Yoshimoto, T., T. Nishimura, T. Kita and D. Tsuru 1983. Post-proline cleaving enzyme (prolyl endopeptidase) from bovine brain. J. Biochem. (Tokyo) 94:1179-1190.

Yoshimoto, T., A.K. Sattar, W. Hirose and D. Tsuru 1988. Studies on prolyl endopeptidase from shakashimeji (*Lyophyllum cinerascens*): purification and enzymatic properties. J. Biochem. (Tokyo) 104:622-627.

Yoshimoto, T., W.H. Simmons, T. Kita and D. Tsuru 1981. Post-proline cleaving enzyme from lamb brain. J. Biochem. 90:325-334.

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

### 도면의 간단한 설명

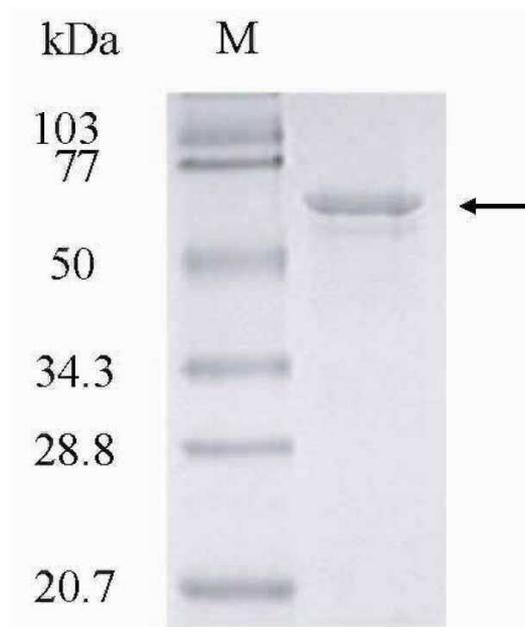
**도 1**은 *Thermococcus* sp. NA1(TNA1), *T. kodakarensis* KOD1 189(TkKOD1, gi:57640358), *P. abyssi* GE5(PaGE5, gi:14521352), *P. furiosus* DSM 3638(PfDSM, gi:77197) 및 *P. horikoshii* OT3(PhOT3, gi:14591079)로부터의 프로릴 올리고펩티다아제 의 서열 비교를 보인다. 대시는 갭(gap)을 의미하고, 오른쪽에 있는 숫자는 원래 서열에서 마지막 잔기의 위치를 나타낸다. 4개의 효소 사이의 같은 잔기는 \*로 나타내었고, 보전된 치환 및 반보전된 치환은 각각 : 및 . 으로 나타내었다. 밑줄그어진 부분이 서열 정렬과 돼지의 POP의 결정구조로부터 예상되는 활성부위를 구성하는 잔기이다. Ser-Asp-His 촉매 트라이어드 시그너처는 굵게 나타냈다.

**도 2**는 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.

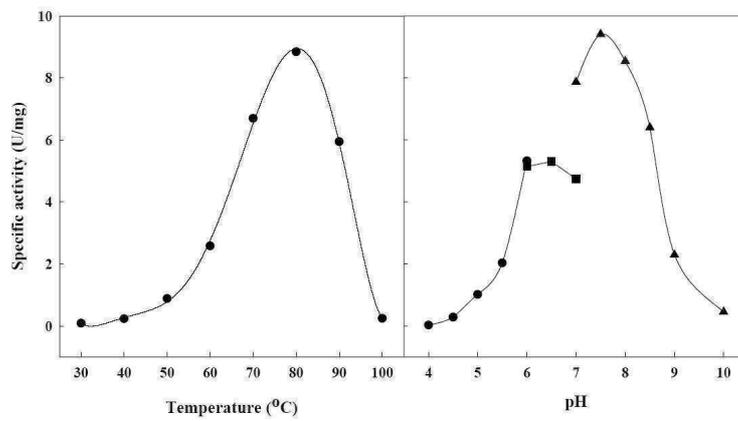
**도 3**은 본 발명에 따른 프로릴올리고펩티다아제(TNA1\_POP)의 활성에 대한 온도(A) 및 pH (B)의 효과를 나타낸다. A: 시료온도를 30 에서 100°C 까지 증가시키며, 표준상태에서 활성분석을 수행하였다. B, C: 소듐 아세트산(원), pH 4-6; 소듐 포스포이트(사각형), pH 6.0-7.0, 트리스-HCl(삼각형), pH 7.0-10.0 (각각 50mM) 완충용액을 사용하였고 표준상태에서 활성분석을 실시하였다.



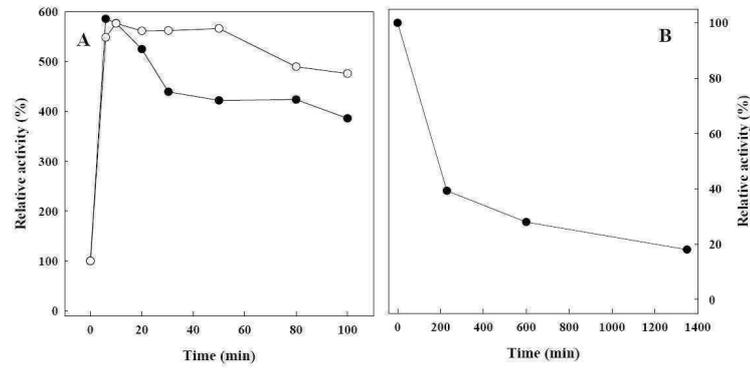
도면2



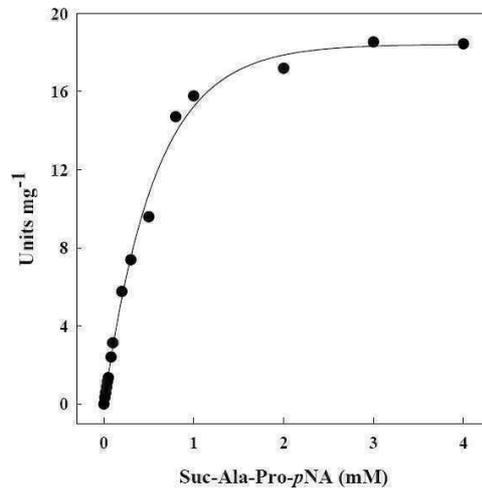
도면3



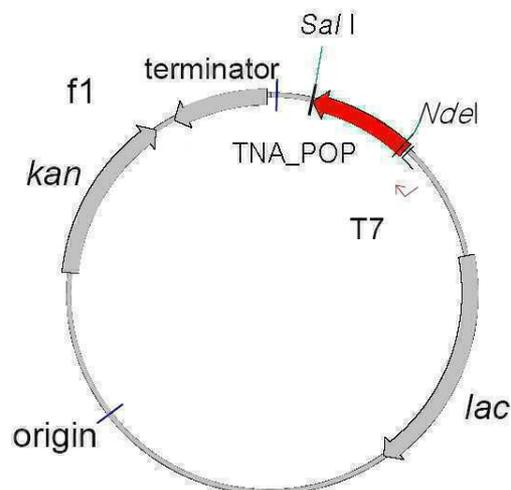
도면4



도면5



도면6



서열목록

<110> KOREA OCEAN RESEARCH AND DEVELOPMENT INSTITUTE

<120> Hyperthermophilic Prolyloligopeptidase and Methods of Preparation Thereof

<160> 4

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 1851

<212> DNA

<213> Thermococcus sp.

<400> 1

atggatgacc cttacatgtg gatggaggac ctccaggacg agcgtgttct caagctggtt 60

gaggaagaga acaaacgctt tagggagttt attggagagc tgagcgacga actgtttccg 120

gaggtctggg agtactactc gatgccaacc ctctacgggg cgaagctaac cgaaaagggc 180

atcatagtga tgttcaagga gagggacagg cagataatta agtggctcgg cggaaaaatt 240

ctagttgact ccaagaggct tgaggaggag cttggcgacg aggttctcct tcaggggttc 300

acagcagacg atgctgggaa acgcctcgcc tacagctttt ccatcggagg cgccgacgag 360

gggataacaa ggatcataga ccttgaaact ggagagctca tcgacgagat gaagccctcg 420

gtctggaacg ttgctttcct ggaaaacggc tactacttcg gcaggttcta cgcaccgac 480

gagacacccg atggcgtaa ggctccagcc gtgaggctct tctggaagga tgagggcgga 540

gagaagatgg tcttcggcga ggggcttagc tccggctact tcatcgggct gagggagagc 600

accgacggaa agtgggcgat ggtagttgtg acctttggct ggaacaaggc tgagatatac 660

ctcggcccca tagaggagcc cgaaaagtgg gagaaggtct actcggccga ggttccggca 720

cagccgatag aagttgtcga tggaaaggtc tacattctca cgaaggaagg aaagggcctc 780

ggaaaggtca tcgcaatcga agacggcgaa atcgaggagg ttatccccga ggatgagttc 840

ccgctggagt gggcagtaat agtgggcaac agaattctag ccggcaggct cgtccatgcc 900

agtcacagac ttgaggtcta ctcaattgat ggcaagaagc ttgacgagat taccttcgac 960

ctgcccggaa gcctctatcc actcgacgcc gatggcaaga aggttatcct tcgatacgag 1020

agcttcacca tcccctacag gctctacgag tttgacgggg agctgaagct tctcgacgag 1080  
 aggaagattg aaggagactt tcaggtgagc gaggactttg cgatctcaaa ggacggaacg 1140  
 agaatccact acttcattgt aaaaggagag aaagacgaga agaaggcctg ggtctttggc 1200  
 tacggcggct tcaacattgc cttaactccg aggttcttcc cgcaggtgat tccgttcata 1260  
 cggcgcggcg gaacctttgt gatggctaac cttagaggag gtagtgaata cggggaagag 1320  
 tggcaccgcg ccggaatgag agaaaacaag cagaacgtct tcgacgactt catagccggt 1380  
 ctcggtaagc ttaaggccga gggctacaag gttgccgcct ggggcaggag caatggtgga 1440  
 ctgctcgtct cagcgacgct cgtccagcgg ccggacgtca tggacgcggc tctgataggc 1500  
 taccctgtca tcgacatggt ccgcttocac aagctctaca tcggcagcgt ttgggttctt 1560  
 gagtacggca accccgacga tccgaaggac agggagtctc tgctcaaata ctcgccttac 1620  
 cataacgtta aagagcaaaa atatccacca acgctcctct aactggctt atatgatgac 1680  
 agggttcatc cagcacacgc cctcaagttt ttcattgaagc taagagcggg cagcgcgccg 1740  
 gtttatctgc gcgtggaaac taagagcggc cacatgggtg cttcgcctga gacgagggca 1800  
 agagaattga ctgacctgct ggcgtttggt gttgagactc tcgaggctta g 1851

<210> 2  
 <211> 616  
 <212> PRT  
 <213> Thermococcus sp.

<400> 2  
 Met Asp Asp Pro Tyr Met Trp Met Glu Asp Leu Gln Asp Glu Arg Val  
 1 5 10 15  
 Leu Lys Leu Val Glu Glu Glu Asn Lys Arg Phe Arg Glu Phe Ile Gly  
 20 25 30  
 Glu Leu Ser Asp Glu Leu Phe Pro Glu Val Trp Glu Tyr Tyr Ser Met  
 35 40 45  
 Pro Thr Leu Tyr Gly Ala Lys Leu Thr Glu Lys Gly Ile Ile Val Met  
 50 55 60  
 Phe Lys Glu Arg Asp Arg Gln Ile Ile Lys Trp Leu Gly Gly Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Leu Val Asp Ser Lys Arg Leu Glu Glu Glu Leu Gly Asp Glu Val Leu  
 85 90 95

Leu Gln Gly Phe Thr Ala Asp Asp Ala Gly Lys Arg Leu Ala Tyr Ser  
 100 105 110

Phe Ser Ile Gly Gly Ala Asp Glu Gly Ile Thr Arg Ile Ile Asp Leu  
 115 120 125

Glu Thr Gly Glu Leu Ile Asp Glu Met Lys Pro Ser Val Trp Asn Val  
 130 135 140

Ala Phe Leu Glu Asn Gly Tyr Tyr Phe Gly Arg Phe Tyr Arg His Asp  
 145 150 155 160

Glu Thr Pro Asp Gly Val Lys Ala Pro Ala Val Arg Leu Phe Trp Lys  
 165 170 175

Asp Glu Gly Gly Glu Lys Met Val Phe Gly Glu Gly Leu Ser Ser Gly  
 180 185 190

Tyr Phe Ile Gly Leu Arg Glu Ser Thr Asp Gly Lys Trp Ala Met Val  
 195 200 205

Val Val Thr Phe Gly Trp Asn Lys Ala Glu Ile Tyr Leu Gly Pro Ile  
 210 215 220

Glu Glu Pro Glu Lys Trp Glu Lys Val Tyr Ser Ala Glu Val Pro Ala  
 225 230 235 240

Gln Pro Ile Glu Val Val Asp Gly Lys Val Tyr Ile Leu Thr Lys Glu  
 245 250 255

Gly Lys Gly Leu Gly Lys Val Ile Ala Ile Glu Asp Gly Glu Ile Glu  
 260 265 270

Glu Val Ile Pro Glu Asp Glu Phe Pro Leu Glu Trp Ala Val Ile Val  
 275 280 285

Gly Asn Arg Ile Leu Ala Gly Arg Leu Val His Ala Ser His Arg Leu  
 290 295 300

Glu Val Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Leu Asp Glu Ile Thr Phe Asp  
 305 310 315 320

Leu Pro Gly Ser Leu Tyr Pro Leu Asp Ala Asp Gly Lys Lys Val Ile  
 325 330 335

Leu Arg Tyr Glu Ser Phe Thr Ile Pro Tyr Arg Leu Tyr Glu Phe Asp  
 340 345 350

Gly Glu Leu Lys Leu Leu Asp Glu Arg Lys Ile Glu Gly Asp Phe Gln  
 355 360 365

Val Ser Glu Asp Phe Ala Ile Ser Lys Asp Gly Thr Arg Ile His Tyr



<220>

<223> prolyl oligopeptidase sense primer

<400> 3

cgacccggca tatggatgac cttacatgt ggatggag

38

<210> 4

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> prolyl oligopeptidase antisense primer

<400> 4

ctccacatgt cgacagcctc gagagtctca acaacaaac

39