



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 33 652 T2** 2006.09.21

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 994 191 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 33 652.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/JP98/02465**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 923 114.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/056926**

(86) PCT-Anmeldetag: **04.06.1998**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **17.12.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **19.04.2000**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **01.03.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **21.09.2006**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C12N 15/57** (2006.01)

**C12N 9/52** (2006.01)

**C12P 21/02** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

**15196997 10.06.1997 JP**

(73) Patentinhaber:

**TAKARA BIO INC., Otsu, Shiga, JP**

(74) Vertreter:

**Dr. Volker Vossius, Corinna Vossius, Tilman Vossius, Dr. Georg Schnappauf, 81679 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**TAKAKURA, Hikaru, Otsu-shiShiga 520-2276, JP;  
MORISHITA, Mio, Otsu-shiShiga 520-0043, JP;  
SHIMOJO, Tomoko, Kyoto-shiKyoto 604-0851, JP;  
ASADA, Kiyozo, Koka-gunShiga 520-3333, JP;  
KATO, Ikunoshin, Uji-shiKyoto 611-0028, JP**

(54) Bezeichnung: **SYSTEM ZUM EXPRIMIEREN EINER HYPERTHERMOSTABILEN PROTEASE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

## Beschreibung

### Technisches Gebiet

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft eine hyperthermostabile Protease, die als ein Enzym zur industriellen Verwendung geeignet ist, ein Gen, das diese kodiert und ein Verfahren zum Herstellen des Enzyms durch Gentechnik.

### Technischer Hintergrund

**[0002]** Eine Protease ist ein Enzym, das Peptidbindungen in Proteinen spaltet. Eine Anzahl an solchen Enzymen ist in Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen gefunden worden. Die Protease wird als ein Reagenz sowohl zur Verwendung im Labor als auch als ein Pharmazeutikum in industriellen Gebieten, zum Beispiel als ein Zusatz zu einem Detergenz, zur Lebensmittelverarbeitung und zur chemischen Synthese unter Verwendung einer reversen Reaktion verwendet. Daher kann gesagt werden, dass die Protease für die Industrie ein außerordentlich wichtiges Enzym ist. Da hohe physikalische und chemische Stabilität für eine Protease benötigt wird, die in industriellen Gebieten verwendet wird, wird bevorzugt ein thermostabiles Enzym gegenüber anderen verwendet. Da durch Bakterien der Gattung *Bacillus* hergestellte Proteasen relativ hohe Thermostabilität aufweisen, werden sie hauptsächlich als Proteasen für industrielle Verwendung verwendet. Jedoch wurden bei der Suche eines besseren Enzyms Versuche unternommen, ein Enzym von einem bei hohen Temperaturen wachsenden Organismus zu erhalten, z.B. einem thermophilen oder einem hyperthermophilen Bakterium der Gattung *Bacillus*.

**[0003]** Zum Beispiel ist das hyperthermophile *Pyrococcus furiosus* für die Herstellung einer Protease bekannt (Appl. Environ. Microbiol., 56:1992-1998 (1990); FEMS Microbiol. Letters, 71:17-20 (1990); J. Gen. Microbiol., 137:1193-1199 (1991)).

**[0004]** Zusätzlich wurde von dem hyperthermophilen *Pyrococcus* sp.-Stamm KOD1 berichtet, dass er eine Thiol-Protease (eine Cystein-Protease) herstellt (Appl. Environ. Microbiol., 60:4559-4566 (1994)). Hyperthermophile der Gattungen *Thermococcus*, *Staphylothermus* und *Thermobacteroides* sind auch für die Herstellung von Proteasen bekannt (Appl. Microbiol. Biotechnol., 34:715-719 (1991)).

**[0005]** Die Proteasen der Hyperthermophilen wie vorstehend beschrieben haben eine hohe Thermostabilität. Daher wird davon ausgegangen, dass sie anstelle der momentan verwendeten thermostabilen Proteasen oder in einem Gebiet verwendet werden können, in dem die Verwendung einer Protease nicht erwägt worden ist.

**[0006]** Jedoch wachsen die meisten der diese Enzyme herstellenden Mikroorganismen nur bei hoher Temperatur. Zum Beispiel muss *Pyrococcus furiosus* bei 90-100°C kultiviert werden. Kultivierung bei solch hoher Temperatur ist im Hinblick auf Energiekosten nachteilig. Des Weiteren sind die Leistungsfähigkeiten der Proteasen von den Hyperthermophilen geringer als die Leistungsfähigkeiten der herkömmlichen mikrobiellen Proteasen. Daher haben die Verfahren zur industriellen Herstellung der Proteasen von Hyperthermophilen Nachteile.

**[0007]** Im Übrigen ist die Herstellung eines Enzyms durch Gentechnik, durch Isolierung des Gens für das Enzym von Interesse und sein Einbringen in einen Wirtsorganismus, der leicht kultiviert werden kann, momentan in der Technik üblich. Jedoch wird das in den Wirt eingebrachte Gen des Enzyms nicht immer so effizient exprimiert wie erwartet. Es wird angenommen, dass der Hauptgrund dafür ist, dass der GC-Gehalt oder die Codon-Verwendung des eingebrachten Gens von denen der Gene des Wirtes unterschiedlich ist. Daher ist es notwendig, das Expressionsverfahren für jedes einzubringende Gen und/oder jeden Wirt zu optimieren, um eine geeignete Leistungsfähigkeit eines Enzyms für die beabsichtigte Verwendung zu erreichen.

### Aufgaben der Erfindung

**[0008]** Die Aufgaben der vorliegenden Erfindung sind die Bereitstellung einer Protease von einem Hyperthermophilen, die vorteilhaft für die industrielle Verwendung ist, die Isolierung eines Gens, das die Protease des Hyperthermophilen kodiert, und die Bereitstellung eines Verfahrens zur Herstellung der hyperthermostabilen Protease unter Verwendung des Gens durch Gentechnik, um die vorstehend beschriebenen Probleme zu lösen.

## Zusammenfassung der Erfindung

**[0009]** Unter den durch Hyperthermophile hergestellten Proteasen können einige als Subtilisin-Typ der alkalischen Proteasen basierend auf der Aminosäure-Sequenzhomologie klassifiziert werden. Wenn ein Gen für solch eine Protease in *Bacillus subtilis* eingeführt wird, das im Allgemeinen zur Herstellung durch Gentechnik verwendet wird, ist die Leistungsfähigkeit dieses Enzyms deutlich geringer als die eines von Natur aus von *Bacillus subtilis* hergestellten Proteins.

**[0010]** Die Erfinder haben nach intensiven Studien herausgefunden, dass durch Platzieren eines für ein Signalpeptid kodierenden Gens (Signalsequenz), abgeleitet von einem Subtilisin, upstream eines zu exprimierenden Protease-Gens, abgeleitet von einem Hyperthermophilen, und durch Modifizieren der Aminosäure-Sequenz um die Spaltstelle, das Gen von Interesse in *Bacillus subtilis* mit hoher Effizienz exprimiert wird. Des Weiteren ist herausgefunden worden, dass der Expressionsgrad des Enzyms durch Entfernen eines Teils, der nicht essentiell für die enzymatische Aktivität ist, im Protease-Gen, abgeleitet vom Hyperthermophilen von Interesse, erhöht werden kann. Folglich ist die vorliegende Erfindung vollständig ausgeführt worden.

**[0011]** Die vorliegende Erfindung wird im Folgenden umrissen.

**[0012]** Der erste Gegenstand der Erfindung ist eine Protease, die aus einer Aminosäuresequenz besteht, in der ein oder mehrere Aminosäurereste vom C-Terminus der Aminosäuresequenz, dargestellt durch die SEQ ID NO:4 des Sequenzprotokolls, entfernt worden sind, und die eine thermostabile Protease-Aktivität aufweist.

**[0013]** In einer Ausführungsform des ersten Gegenstands der Erfindung besteht die Protease aus der Aminosäuresequenz, dargestellt durch die SEQ ID NO:1 des Sequenzprotokolls.

**[0014]** Der zweite Gegenstand der Erfindung ist ein Gen, das für ein Protein kodiert, das aus einer Aminosäuresequenz besteht, in der ein oder mehrere Aminosäurereste vom C-Terminus der Aminosäuresequenz, dargestellt durch die SEQ ID NO:4 des Sequenzprotokolls, entfernt worden sind, und das eine thermostabile Protease-Aktivität aufweist.

**[0015]** In einer Ausführungsform des zweiten Gegenstands der Erfindung kodiert das Protease-Gen die Aminosäuresequenz, dargestellt durch die SEQ ID NO:1 des Sequenzprotokolls.

**[0016]** In einer zweiten Ausführungsform besteht das Protease-Gen aus der Basensequenz, dargestellt durch die SEQ ID NO:2 des Sequenzprotokolls.

**[0017]** Der dritte Gegenstand der Erfindung ist ein Protease-Gen, das mit dem Protease-Gen gemäß der zweiten Ausführungsform des zweiten Gegenstands der Erfindung unter Bedingungen hybridisiert, die durch 6×SSC mit 0,5% SDS, 0,1% Rinderserumalbumin (BSA), 0,1% Polyvinylpyrrolidon, 0,1% Ficoll 400, 0,01% denaturierte Lachs-Sperma-DNA bei 50°C definiert sind, und das ein Protein mit einer thermostabilen Protease-Aktivität kodiert.

**[0018]** Der vierte Gegenstand der Erfindung ist ein Gen, das eine Aminosäuresequenz kodiert, dargestellt durch Formel I: SIG-Ala-Gly-Gly-Asn-PRO, wobei SIG eine Aminosäuresequenz eines Signalpeptids, abgeleitet von einem Subtilisin, darstellt und PRO die Aminosäuresequenz der Protease gemäß des ersten Gegenstands der Erfindung umfasst.

**[0019]** Der fünfte Gegenstand der Erfindung ist ein Plasmid-Vektor, der das Gen gemäß dem vierten Gegenstand der Erfindung umfasst.

**[0020]** In einer Ausführungsform des fünften Gegenstands der Erfindung ist der Plasmid-Vektor pSPO124ΔC (FERM BP-6294).

**[0021]** Der sechste Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines Proteins, das die Kultivierung eines Bakteriums der Gattung *Bacillus*, in welches der Plasmid-Vektor gemäß des fünften Gegenstands der Erfindung eingeführt ist, und die Isolierung des Proteins von Interesse aus der Kultur umfasst.

**[0022]** In einer Ausführungsform des sechsten Gegenstands der Erfindung ist das Bakterium der Gattung *Bacillus* *Bacillus subtilis*.

**[0023]** In einer weiteren Ausführungsform wird das Plasmid pSPO124  $\Delta$  C (FERM BP-6294) in das Bakterium der Gattung *Bacillus* eingeführt.

**[0024]** In noch einer weiteren Ausführungsform umfasst das Verfahren die Kultivierung von *Bacillus subtilis* DB104/pSPO124  $\Delta$  C FERM BP-6294 und das Isolieren des Proteins von Interesse aus der Kultur.

**[0025]** Eine Mutation wie Deletion, Substitution, Insertion oder Addition von einem bis einigen Aminosäureresten in einer Aminosäuresequenz kann in einem natürlich vorkommenden Protein einschließlich des durch die vorliegende Erfindung offenbarten Proteins gebildet werden. Solch eine Mutation kann aufgrund eines Polymorphismus oder einer Mutation des das Protein kodierenden Gens gebildet werden oder sie kann aufgrund einer Modifikation des Proteins in vivo oder während Reinigung nach der Synthese geschehen. Dennoch ist es bekannt, dass solch ein mutiertes Protein physiologische und biologische Aktivitäten aufweisen kann, die äquivalent zu denen eines Proteins ohne eine Mutation sind. Dies ist auf ein Protein anwendbar, in das solch eine Mutation künstlich in seine Aminosäuresequenz eingeführt wird. In diesem Fall ist es möglich, eine große Vielfalt an Mutationen zu bilden. Zum Beispiel ist bekannt, dass ein Polypeptid, in dem ein Cystein-Rest in der Aminosäuresequenz des humanen Interleukin-2 (IL-2) durch einen Serin-Rest ersetzt wird, eine Interleukin-2-Aktivität beibehält (Science, 224:1431 (1984)). Folglich kann eine Protease mit einer Aminosäuresequenz, in der ein oder mehrere Aminosäurereste in der Aminosäuresequenz, offenbart durch die vorliegende Erfindung, deletiert, substituiert, inseriert oder addiert sind, und mit einer Protease-Aktivität, die äquivalent zu der der erfindungsgemäßen Protease ist, gebildet werden.

**[0026]** Soweit hierin verwendet ist "ein Gen, das (mit einem bestimmten Gen) hybridisiert", ein Gen mit einer Basensequenz ähnlich zu der des bestimmten Gens. Es ist wahrscheinlich, dass ein Gen mit einer Basensequenz ähnlich zu der eines bestimmten Gens ein Protein kodiert mit einer Aminosäuresequenz und einer Funktion ähnlich zu denen des durch das bestimmte Gen kodierten Proteins. Ähnlichkeiten von Basensequenzen von Genen können durch die Bestimmung untersucht werden, ob die Gene oder Teile davon ein Hybrid miteinander unter stringenten Bedingungen bilden (hybridisieren) oder nicht. Durch Ausnutzung dieses Verfahrens kann ein Gen erhalten werden, das ein Protein kodiert mit einer ähnlichen Funktion wie der des durch das bestimmte Gen kodierten Proteins. Das heißt, dass ein Gen mit einer zu der des Gens der vorliegenden Erfindung ähnlichen Basensequenz durch Verwendung des durch die vorliegende Erfindung erhaltenen Gens oder einem Teil davon als eine Sonde zum Ausführen einer Hybridisierung gemäß eines bekannten Verfahrens erhalten werden kann. Hybridisierung kann gemäß des Verfahrens ausgeführt werden, z.B. wie beschrieben in T. Maniatis et al., Hrsg., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, veröffentlicht von Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. Insbesondere kann Hybridisierung unter den folgenden Bedingungen ausgeführt werden. Kurz zusammengefasst wird eine Membran, auf die DNAs immobilisiert worden sind, in 6×SSC (1×SSC bedeutet 0,15 M NaCl, 0,015 M Natriumcitrat, pH 7,0) mit 0,5% SDS, 0,1% Rinderserumalbumin (BSA), 0,1% Polyvinylpyrrolidon, 0,1% Ficoll 400, 0,01% denaturierter Lachs-Sperma-DNA bei 50°C für 12-20 Stunden mit einer Sonde inkubiert. Nach Inkubation wird die Membran gewaschen, bis die Signale für die immobilisierten DNAs vom Hintergrund unterschieden werden können, angefangen mit Waschen in 2×SSC mit 0,5% SDS bei 37°C unter Verringerung der SSC-Konzentration bis 0,1x und Erhöhung der Temperatur bis 50°C.

**[0027]** Alternativ kann anstatt der Hybridisierung ein Gen-Vervielfältigungsverfahren (z.B. ein PCR-Verfahren) verwendet werden, das Teile der Basensequenz des durch die vorliegende Erfindung erhaltenen Gens als Primer einsetzt. Ob das dadurch erhaltene Gen ein Protein mit der Funktion von Interesse kodiert oder nicht, kann durch Expression des Gens unter Verwendung eines geeigneten Wirts und eines geeigneten Expressionssystems und Untersuchung der Aktivität des erhaltenen Proteins bestimmt werden.

#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

**[0028]** [Fig. 1](#) ist die Restriktionsenzym-Karte des Plasmids pSTC3.

**[0029]** [Fig. 2](#) vergleicht die Aminosäuresequenzen der Protease PFUS, der Protease TCES und eines Subtilisins.

**[0030]** [Fig. 3](#) vergleicht die Aminosäuresequenzen der Protease PFUS, der Protease TCES und eines Subtilisins.

**[0031]** [Fig. 4](#) vergleicht die Aminosäuresequenzen der Protease PFUS, der Protease TCES und eines Subtilisins.

- [0032] [Fig. 5](#) vergleicht die Aminosäuresequenzen der Protease PFUS, der Protease TCES und eines Subtilisins.
- [0033] [Fig. 6](#) ist die Restriktionsenzym-Karte des Plasmids pSNP1.
- [0034] [Fig. 7](#) ist die Restriktionsenzym-Karte des Plasmids pPS1.
- [0035] [Fig. 8](#) ist die Restriktionsenzym-Karte des Plasmids pNAPS1.

#### Genauere Beschreibung der Erfindung

[0036] Die erfindungsgemäße hyperthermostabile Protease umfasst Proteasen von verschiedenen Hyperthermophilen. Zum Beispiel beschreibt WO 95/34645 Proteasen von *Pyrococcus furiosus* und *Thermococcus celer*.

[0037] Ein Protease-Gen von *Pyrococcus furiosus* DSM3638 wurde aus einer genomischen DNA-Bibliothek des Stamms basierend auf der Expression einer thermostabilen Protease-Aktivität isoliert. Ein dieses Gen enthaltendes Plasmid wird als Plasmid pTPR12 bezeichnet. Mit diesem Plasmid transformiertes *Escherichia coli* JM109 wird bezeichnet und gekennzeichnet als *Escherichia coli* JM109/pTPR12 und wurde am 24. Mai 1994 (Datum der ursprünglichen Hinterlegung) gemäß dem Budapester Vertrag am Nationalen Institut für Biowissenschaft und Humantechnologie, Amt für industrielle Wissenschaft und Technologie, Ministerium für internationalen Handel und Industrie, 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japan unter der Zugangsnummer FERM BP-5103 hinterlegt.

[0038] Diese Protease wird hierin nachstehend als Protease PFUL bezeichnet. Protease PFUL ist eine Protease mit hoher Thermostabilität und weist eine Protease-Aktivität sogar bei 95°C auf.

[0039] Die Basensequenz des von *Pyrococcus furiosus* abgeleiteten DNA-Fragments, eingefügt in das Plasmid pTPR12, ist bestimmt worden. Die Basensequenz des etwa 4,8 kb großen, von zwei DnaI-Schnittstellen flankierten Teils des in das Plasmid pTPR12 eingefügten DNA-Fragments ist in der SEQ ID NO:5 des Sequenzprotokolls gezeigt. Des Weiteren ist die Aminosäuresequenz des von dieser Basensequenz abgeleiteten Genprodukts in der SEQ ID NO:6 des Sequenzprotokolls gezeigt. Mit anderen Worten ist die in der SEQ ID NO:6 des Sequenzprotokolls gezeigte Aminosäuresequenz, die Aminosäuresequenz der Protease PFUL. Wie in der Sequenz gezeigt besteht die Protease PFUL aus 1398 Aminosäureresten und ist eine Protease mit einem hohen Molekulargewicht von über 150 000.

[0040] Ein Vergleich der Aminosäuresequenz der Protease PFUL, wie gezeigt in SEQ ID NO:6 des Sequenzprotokolls, mit bekannten Aminosäuresequenzen von Proteasen von Mikroorganismen hat gezeigt, dass die Aminosäuresequenz der ersten Hälfte der Protease PFUL homolog zu denen einer Reihe von alkalischen Serin-Proteasen ist, dargestellt durch ein Subtilisin (Protein Engineering, 4:719-737 (1991)). Es gibt eine extrem hohe Homologie um die vier Aminosäurereste, von denen angenommen wird, dass sie wichtig für die katalytische Aktivität der Protease sind.

[0041] Wie vorstehend beschrieben ist herausgefunden worden, dass eine unter Proteasen abgeleitet von Mesophilen gemeinsame Region in der Aminosäuresequenz der Protease PFUL, hergestellt durch ein hyperthermophiles *Pyrococcus furiosus*, konserviert ist. Daher wird davon ausgegangen, dass eine durch ein anderes Hyperthermophil als *Pyrococcus furiosus* hergestellte Protease ebenfalls diese Region aufweist.

[0042] Zum Beispiel kann ein Gen für eine hyperthermostabile Protease mittels Durchführung einer PCR unter Verwendung einer chromosomalen DNA von verschiedenen Hyperthermophilen als ein Template und der Oligonukleotide PRO-1F, PRO-2F, PRO-2R und PRO-4R in Kombination als Primer gescreent werden. Diese Oligonukleotide werden basierend auf der Basensequenz im Gen der Protease PFUL synthetisiert, die eine Region in der Aminosäuresequenz der Protease PFUL kodiert, die hohe Homologie mit Subtilisinen oder dergleichen aufweist. Die Basensequenzen der Oligonukleotide PRO-1F, PRO-2F, PRO-2R und PRO-4R sind in den SEQ ID NOs: 7, 8, 9 bzw. 10 des Sequenzprotokolls gezeigt.

[0043] Als ein Hyperthermophil, von dem die erfindungsgemäße Protease abgeleitet ist, kann ein Bakterium verwendet werden, das zur Gattung *Pyrococcus*, *Thermococcus*, *Staphylothermus*, *Thermobacteroides* und dergleichen gehört. Als ein Bakterium, das zur Gattung *Thermococcus* gehört, kann z.B. *Thermococcus celer* DSM2476 verwendet werden. Dieser Stamm ist von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zell-

kulturen GmbH erhältlich. Bei Durchführung einer PCR unter Verwendung einer chromosomalen DNA von *Thermococcus celer* DSM2476 als ein Template und einer Kombination der Oligonukleotide PRO-1F und PRO-2R oder der Oligonukleotide PRO-2F und PRO-4R als Primer werden spezifische DNA-Fragmente amplifiziert, was die Anwesenheit eines Protease-Gens anzeigt. Des weiteren können durch Herstellung rekombinanter Plasmide, in denen die DNA-Fragmente in einen geeigneten Plasmid-Vektor eingefügt sind, und Bestimmung der Basensequenzen der eingefügten DNA-Fragmente durch ein Didesoxy-Verfahren, die durch die Fragmente kodierten Aminosäuresequenzen abgeleitet werden. Als Ergebnis ist es erwiesen, dass solche DNA-Fragmente eine Aminosäuresequenz kodieren, die homolog zu den Aminosäuresequenzen der Protease PFUL und alkalischer Serinproteasen von verschiedenen Mikroorganismen ist, und dass die PCR-amplifizierten DNA-Fragmente von einem Protease-Gen als ein Template amplifiziert wurden.

**[0044]** Als nächstes kann ein Gen für eine hyperthermostabile Protease (zum Beispiel ein Gen für eine hyperthermostabile Protease hergestellt durch *Thermococcus celer*) durch Screenen einer Gen-Bibliothek von einem Hyperthermophilen unter Verwendung des PCR-amplifizierten DNA-Fragments oder des Oligonukleotids wie vorstehend beschrieben als eine Sonde erhalten werden.

**[0045]** Zum Beispiel kann ein das Gen von Interesse enthaltender Phagen-Klon mittels Durchführen einer Plaque-Hybridisierung gegen eine Bibliothek unter Verwendung des PCR-amplifizierten DNA-Fragments als eine Sonde erhalten werden. Solch eine Bibliothek wird durch Ligation von lambda-GEM-11-Vektor (Promega) und DNA-Fragmenten, die aus einem teilweisen Verdau der chromosomalen DNA von *Thermococcus celer* DSM2476 mit dem Restriktionsenzym Sau3AI erhalten wurden, und dann durch Verpackung von diesen in lambda-Phagenpartikel mittels eines in vitro-Verpackungsverfahrens gebildet.

**[0046]** Es ist durch Analyse eines DNA-Fragments, das in einem so erhaltenen Phagen-Klonen enthalten ist, herausgefunden worden, dass ein Protease-Gen in einem SacI-Fragment von etwa 1,9 kb enthalten ist. Des weiteren ist durch Bestimmung seiner Basensequenz herausgefunden worden, dass diesem Fragment die 5'-Region des Protease-Gens fehlt. Die 5'-Region kann durch PCR unter Verwendung einer Kasette und von Kassettenprimern erhalten werden (Takara Shuzo Gene Technology Product Guide, 1994-1995, Seiten 250-251). Folglich kann ein DNA-Fragment erhalten werden, das die 5'-Region des Gens der hypothermostabilen Protease umfasst, die in dem Plasmid pTCS6 nicht vorhanden ist. Des weiteren kann die Basensequenz des gesamten Gens der hyperthermostabilen Protease abgeleitet von *Thermococcus celer* aus den Basensequenzen der zwei DNA-Fragmente bestimmt werden.

**[0047]** Die Basensequenz eines in der bestimmten Basensequenz gefundenen offenen Leserahmens ist in der SEQ ID NO:11 des Sequenzprotokolls gezeigt, und die von dieser Basensequenz abgeleitete Aminosäuresequenz ist in der SEQ ID NO:12 des Sequenzprotokolls gezeigt. Die Basensequenz des Gens, das die hyperthermostabile Protease von *Thermococcus celer* kodiert, und die Aminosäuresequenz der Protease wurden daher bestimmt. Diese Protease wird als Protease TCES bezeichnet.

**[0048]** Ein Expressionsvektor, in dem das gesamte Gen der Protease TCES durch Kombinieren der zwei DNA-Fragmente wiederhergestellt worden ist, kann konstruiert werden. Als jedoch *Escherichia coli* als Wirt verwendet wurde, wurden keine Transformanten erhalten, in die das Expressionsplasmid von Interesse eingeführt worden war, wahrscheinlich weil die Bildung des von dem Gen exprimierten Produkts in Zellen schädlich oder tödlich für *Escherichia coli* sein kann. In solch einem Fall ist es z.B. möglich, *Bacillus subtilis* als Wirt für eine extrazelluläre Sekretion der Protease zu verwenden und die Aktivität zu bestimmen.

**[0049]** Als ein *Bacillus subtilis*-Stamm kann *Bacillus subtilis* DB 104 verwendet werden, der ein bekannter Stamm ist wie beschrieben in *Gene*, 83:215-233 (1989). Als ein Klonierungsvektor kann das Plasmid pUB 18-P43 verwendet werden, das ein Geschenk von Dr. Sui-Lam Wong, University of Calgary, ist. Das Plasmid enthält ein Kanamycin-Resistenzgen als einen selektierbaren Marker.

**[0050]** Ein rekombinantes Plasmid, in dem das Gen der Protease TCES downstream des Promoters P43 in dem Plasmid-Vektor pUB 18-P43 eingefügt ist, wird als Plasmid pSTC3 bezeichnet. Mit diesem Plasmid transformiertes *Bacillus subtilis* DB 104 wird bezeichnet und gekennzeichnet als *Bacillus subtilis* DB 104/pSTC3 und wurde am 1. Dezember 1995 (Datum der ursprünglichen Hinterlegung) gemäß dem Budapester Vertrag am Nationalen Institut für Biowissenschaft und Humantechnologie, Amt für Industrielle Wissenschaft und Technologie, Ministerium für Internationalen Handel und Industrie, 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japan unter der Zugangsnummer FERM BP-5635 hinterlegt.

**[0051]** Die Restriktionsenzym-Karte des Plasmids pSTC3 ist in [Fig. 1](#) gezeigt. In [Fig. 1](#) kennzeichnet die brei-

te Linie das DNA-Fragment, das in den Plasmid-Vektor pUB 18-P43 eingefügt worden ist.

**[0052]** Eine thermostabile Protease-Aktivität ist sowohl im Überstand als auch im Zellextrakt der Kultur von *Bacillus subtilis* DB104/pSTC3 gefunden worden.

**[0053]** Die Haupteigenschaften einer ungereinigten Enzym-Präparation der Protease erhalten von der Kultur des Transformanten sind wie folgt.

(1) Aktivität:

**[0054]** Baut Casein und Gelatine unter Bildung kurzkettiger Polypeptide ab.

**[0055]** Hydrolysiert Succinyl-L-leucyl-L-leucyl-L-valyl-L-tyrosin-4-methylcoumarin-7-amid (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA) unter Bildung einer fluoreszierenden Substanz (7-Amino-4-methylcoumarin).

**[0056]** Hydrolysiert Succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-prolyl-L-phenylalanin-p-nitroanilid (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-p-NA) unter Bildung einer gelben Substanz (p-Nitroanilin).

(2) Optimale Temperatur:

**[0057]** Weist eine enzymatische Aktivität bei 37-95°C mit der optimalen Temperatur bei 70-80°C auf.

(3) Optimaler pH:

**[0058]** Weist eine enzymatische Aktivität bei pH 5,5-9 mit dem optimalen pH bei pH 7-8 auf.

(4) Thermostabilität:

**[0059]** Behält 90% oder mehr von ihrer enzymatischen Aktivität nach Behandlung bei 80°C für 3 Stunden.

**[0060]** Beim Abgleich der Aminosäuresequenzen der Protease PFUL, der Protease TCES und eines Subtilisins (Subtilisin BNP'; Nucl. Acids Res., 11:7911-7925 (1983)), so dass homologe Regionen sich zueinander anordnen wie gezeigt in [Fig. 2-Fig. 5](#), wurde herausgefunden, dass am C-Terminus und zwischen den homologen Regionen der Protease PFUL Sequenzen liegen, die nicht in der Protease TCES oder dem Subtilisin gefunden werden. Nach diesen Ergebnissen kann eine Protease mit einem Molekulargewicht geringer als das der Protease PFUL und ähnlich zu dem der Protease TCES oder von Subtilisinen in *Pyrococcus furiosus* zusätzlich zur Protease PFUL vorkommen.

**[0061]** Daraufhin wurde eine Southern-Hybridisierung gegen eine chromosomale DNA hergestellt aus *Pyrococcus furiosus* unter Verwendung einer DNA-Sonde aus der homologen Region durchgeführt. Es wurde ein Signal beobachtet, das unterschiedlich von dem für das Gen der Protease PFUL war, was auf die Existenz eines anderen Protease-Gens hinweist.

**[0062]** Dieses neue Protease-Gen kann durch das folgende Verfahren isoliert werden.

**[0063]** Zum Beispiel wird ein DNA-Fragment, das ein für die neue Protease kodierendes Gen enthält, durch Verdau einer chromosomalen DNA von *Pyrococcus furiosus* mit einem geeigneten Restriktionsenzym und Durchführung einer Southern-Hybridisierung gegen die verdaute DNA wie vorstehend beschrieben erhalten. Die Basensequenz des DNA-Fragments wird bestimmt, um zu bestätigen, dass die Basensequenz eine Aminosäuresequenz kodiert, die homolog zu der vorstehend genannten Protease ist. Wenn das DNA-Fragment nicht das gesamte Gen von Interesse enthält, wird der restliche Teil des weiteren durch ein inverses PCR-Verfahren oder dergleichen erhalten.

**[0064]** Wenn zum Beispiel eine chromosomale DNA von *Pyrococcus furiosus* mit den Restriktionsenzymen *SacI* und *SpeI* (Takara Shuzo) verdaut und für eine Southern-Hybridisierung verwendet wird, wird ein Signal mit einer Größe von etwa 0,6 kb beobachtet. DNA-Fragmente dieser Größe werden isoliert und zwischen die *SpeI-SacI*-Stellen in den Plasmid-Vektor pBluescript SK(-) (Stratagene) eingefügt, und *Escherichia coli* JM 109 wird mit den erhaltenen rekombinanten Plasmiden transformiert. Ein Klon, in den das Fragment von Interesse eingebaut worden ist, kann von den Transformanten durch Kolonie-Hybridisierung unter Verwendung der gleichen Sonde wie die, die für die Southern-Hybridisierung wie vorstehend beschrieben verwendet wurde, erhalten

ten werden. Ob das in den erhaltenen Klonen enthaltene Plasmid die Sequenz hat, die die Protease kodiert oder nicht, kann durch Bestimmung der Basensequenz des DNA-Fragments, das in das Plasmid eingefügt worden ist, bestätigt werden. Die Anwesenheit des Protease-Gens in dem Plasmid wurde dadurch bestätigt. Dieses Plasmid wird als das Plasmid pSS3 bezeichnet.

**[0065]** Es ist herausgefunden worden, dass die Aminosäuresequenz, die von der Basensequenz des in das Plasmid pSS3 eingefügten DNA-Fragments abgeleitet worden ist, Homologie mit Sequenzen von Subtilisinen, der Protease PFUL, der Protease TCES und dergleichen hat. Das Produkt des von dem Gen der Protease PFUL unterschiedlichen Protease-Gens, von dem ein Teil neu von *Pyrococcus furiosus* wie vorstehend beschrieben erhalten worden war, wird als Protease PFUS bezeichnet. Die Regionen, die die N-terminalen und C-terminalen Regionen der Protease kodieren, können durch ein inverses PCR-Verfahren erhalten werden.

**[0066]** Für eine inverse PCR verwendete Primer können basierend auf der Basensequenz des DNA-Fragments, das in das Plasmid pSS3 eingefügt worden ist, hergestellt werden. Eine chromosomale DNA von *Pyrococcus furiosus* wird mit einem geeigneten Restriktionsenzym verdaut und die erhaltenen DNA-Fragmente werden dann einer intramolekularen Ligationsreaktion unterworfen. Durch Durchführung einer PCR unter Verwendung des Reaktionsgemisches als Template und der vorstehend genannten Primer können DNA-Fragmente erhalten werden, die den Regionen entsprechen, die das Fragment des Protease-Gens flankieren, das in dem Plasmid pSS3 enthalten ist. Die Aminosäuresequenz des durch diese Regionen kodierten Enzymproteins kann durch Analyse der Basensequenzen der so erhaltenen DNA-Fragmente abgeleitet werden. Des Weiteren können Primer hergestellt werden, die zur Amplifikation des gesamten Gens der Protease PFUS unter Verwendung einer chromosomalen DNA von *Pyrococcus furiosus* als Template imstande sind. Die Primer NPF-4 und NPR-4 können entworfen werden. Der Primer NPF-4 hat die Basensequenz, die direkt upstream des Anfangscodons des Gens der Protease PFUS liegt, und kann eine BamHI-Schnittstelle 5' zu der Sequenz einfügen. Der Primer NPR-4 hat eine Sequenz, die komplementär zu dem 3'-Teil des Gens der Protease PFUS ist, und kann eine SphI-Schnittstelle 5' zu der Sequenz einfügen.

**[0067]** Die Basensequenzen der Primer NPF-4 und NPR-4 sind in den SEQ ID NOs: 13 und 14 des Sequenzprotokolls gezeigt. Diese zwei Primer können zur Amplifikation des gesamten Gens der Protease PFUS unter Verwendung einer chromosomalen DNA von *Pyrococcus furiosus* als Template verwendet werden.

**[0068]** Wie die Protease TCES kann die Protease PFUS in *Bacillus subtilis* als Wirt exprimiert werden. Ein Plasmid zur Expression der Protease PFUS kann basierend auf dem Expressionsplasmid für die Protease TCES, pSTC3, hergestellt werden. Insbesondere kann ein Plasmid zur Expression der Protease PFUS durch Ersetzen des Gens der Protease TCES im Plasmid pSTC3 mit dem DNA-Fragment, das das gesamte Gen der Protease PFUS enthält und durch PCR mit den Primern wie vorstehend beschrieben amplifiziert worden ist, hergestellt werden. Das so hergestellte Expressionsplasmid wird als das Plasmid pSNP1 bezeichnet. Mit diesem Plasmid transformiertes *Bacillus subtilis* DB 104 wird bezeichnet und gekennzeichnet als *Bacillus subtilis* DB104/pSNP1 und wurde am 1. Dezember 1995 (Datum der ursprünglichen Hinterlegung) gemäß dem Budapest-Vertrag am Nationalen Institut für Biowissenschaft und Humantechnologie, Amt für Industrielle Wissenschaft und Technologie, Ministerium für Internationalen Handel und Industrie, 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japan unter der Zugangsnummer FERM BP-5634 hinterlegt. Die Restriktionsenzym-Karte des Plasmids pSNP1 ist in [Fig. 6](#) gezeigt.

**[0069]** Die Basensequenz, die einem offenen Leserahmen in dem für die Protease PFUS kodierenden Gen entspricht, und die Aminosäuresequenz der Protease PFUS, die von der Basensequenz abgeleitet ist, sind in den SEQ ID NOs: 15 bzw. 16 des Sequenzprotokolls bezeichnet.

**[0070]** Eine thermostabile Protease-Aktivität wurde sowohl in dem Überstand als auch in dem Zellextrakt der Kultur von *Bacillus subtilis* DB104/pSNP1 gefunden. Das heißt, dass ein Teil der exprimierten Protease PFUS in den Überstand der Kultur sekretiert wird.

**[0071]** Die Haupteigenschaften der Protease, die aus der Kultur des Transformanten erhalten worden ist, sind wie folgt.

(1) Aktivität:

**[0072]** Baut Casein und Gelatine unter Bildung kurzkettiger Polypeptide ab.

**[0073]** Hydrolysiert Succinyl-L-leucyl-L-leucyl-L-valyl-L-tyrosin-4-methylcoumarin-7-amid

(Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA) unter Bildung einer fluoreszierenden Substanz (7-Amino-4-methylcoumarin).

**[0074]** Hydrolysiert Succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-prolyl-L-phenylalanin-p-nitroanilid (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-p-NA) unter Bildung einer gelben Substanz (p-Nitroanilin).

(2) Optimale Temperatur:

**[0075]** Weist eine enzymatische Aktivität bei 40-110°C mit der optimalen Temperatur von 80-95°C auf.

(3) Optimaler pH:

**[0076]** Weist eine enzymatische Aktivität bei pH 5-10 mit dem optimalen pH bei pH 6-8 auf.

(4) Thermostabilität:

**[0077]** Behält 90% oder mehr von ihrer enzymatischen Aktivität nach Behandlung bei 95°C für 8 Stunden.

(5) pH-Stabilität:

**[0078]** Behält 95% oder mehr von ihrer Aktivität nach Behandlung bei pH 5-11 bei 95°C für 60 Minuten.

(6) Molekulargewicht:

**[0079]** Weist ein Molekulargewicht von etwa 45 kDa auf einer SDS-PAGE auf.

**[0080]** Protease-Gene, die homolog zu dem Gen der Protease TCES und dem Gen der Protease PFUS sind, können aus anderen Hyperthermophilen als *Pyrococcus furiosus* und *Thermococcus celer* unter Verwendung eines Verfahrens erhalten werden, das ähnlich zu dem ist, das zum Erhalten des Gens der Protease TCES und des Gens der Protease PFUS verwendet worden ist.

**[0081]** Ein DNA-Fragment von etwa 1 kb, das eine Sequenz von dem Rest an Position 323 zu dem Rest an Position 650 der Aminosäure-Sequenz der Protease PFUL wie in SEQ ID NO:6 des Sequenzprotokolls gezeigt kodiert, kann hergestellt werden und als eine Sonde für eine genomische Southern-Hybridisierung gegen chromosomale DNAs von *Staphylothermus marinus* DSM3639 und *Thermobacteroides proteoliticus* DSM 5265 verwendet werden. Als ein Ergebnis werden Signale an der Position von etwa 4,8 kb für die mit PstI (Takara Shuzo) verdaute chromosomale DNA von *Staphylothermus marinus* und an der Position von etwa 3,5 kb für die mit XbaI verdaute chromosomale DNA von *Thermobacteroides proteoliticus* beobachtet.

**[0082]** Mit diesen Ergebnissen wurde bewiesen, dass es Sequenzen auf den chromosomalen DNAs von *Staphylothermus marinus* und *Thermobacteroides proteoliticus* gibt, die homolog zu denen der Gene der Protease PFUL, der Protease PFUS, der Protease TCES und dergleichen sind. Die die hyperthermostabilen Proteasen kodierenden Gene in *Staphylothermus marinus* und *Thermobacteroides proteoliticus* können von den so detektierten DNA-Fragmenten durch Verwenden eines Verfahrens isoliert und identifiziert werden, das zur Isolierung und Identifizierung der die Protease TCES und die Protease PFUS kodierenden Gene verwendet wurde.

**[0083]** Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass die Verwendung eines Promotors, der wirksam in einem Wirt arbeitet, vorteilhaft gegenüber einem Promotor, der inhärent mit dem das Protein von Interesse kodierenden Gen assoziiert ist, zur Herstellung eines Proteins in einer großen Menge durch Gentechnik sein würde. Obwohl der P43-Promotor, der zur Herstellung der Expressionssysteme für die Protease TCES und die Protease PFUS verwendet wurde, ein von *Bacillus subtilis* abgeleiteter Promotor ist, war er für die Expression der zwei Proteasen nicht ausreichend wirksam.

**[0084]** Daher kann ein Gen, das zu einem hohen Grad in *Bacillus subtilis* exprimiert wird, insbesondere ein Gen für ein sekretiertes Protein, zur Erhöhung des Expressionsgrads verwendet werden. Gene für  $\alpha$ -Amylase oder verschiedene extrazelluläre Proteasen können verwendet werden. Zum Beispiel wird erwartet, dass die Verwendung eines Promotors und einer Signalpeptid-kodierenden Region eines Subtilisin-Gens den Expressionsgrad der Protease PFUS erhöhen kann.

**[0085]** Insbesondere kann die Protease PFUS als ein Fusionsprotein unter Kontrolle des Promotors des Subtilisin-Gens durch Platzieren des gesamten Gens der Protease PFUS downstream der Region, die das Signal-

peptid des Subtilisin-Gens kodiert, einschließlich der Promotorregion exprimiert werden, so dass die Translationsrahmen der zwei Gene übereinstimmen.

**[0086]** Zum Beispiel kann das Gen, das Subtilisin E kodiert, als das erfindungsgemäß verwendete Subtilisin-Gen verwendet werden. Der Promotor und die Signalpeptid-kodierende Region des Subtilisin E-Gens, die in das Plasmid pKWZ wie beschrieben in J. Bacteriol., 171:2657-2665 (1989) eingefügt worden sind, können verwendet werden. Die Basensequenz der 5'-upstream-Region einschließlich der Promotorsequenz ist in der Referenz (supra) beschrieben und die Basensequenz der Region, die Subtilisin kodiert, ist in J. Bacteriol., 158:411-418 (1984) beschrieben.

**[0087]** Basierend auf diesen Sequenzen werden der Primer SUB4 zum Einfügen einer EcoRI-Schnittstelle upstream von der Promotorsequenz des Gens und der Primer BmR1 zum Einfügen einer BamHI-Schnittstelle downstream der das Signalpeptid von Subtilisin E kodierenden Region synthetisiert. Die Basensequenzen der Primer SUB4 und BmR1 sind in den SEQ ID NOs:17 bzw. 18 des Sequenzprotokolls gezeigt. Die Primer SUB4 und BmR1 können zur Amplifikation eines DNA-Fragments von etwa 0,3 kb, das den Promotor und die Signalpeptid-kodierende Region des Subtilisin E-Gens enthält, mittels PCR unter Verwendung des Plasmids pKWZ als Template verwendet werden.

**[0088]** Das Gen der Protease PFUS, das downstream des DNA-Fragments eingefügt werden soll, kann von einer chromosomalen DNA von *Pyrococcus furiosus* durch ein PCR-Verfahren erhalten werden. Der Primer NPF-4 kann als ein Primer verwendet werden, der mit der 5'-Region des Gens hybridisiert. Der Primer NPM-1, der basierend auf der Basensequenz downstream des Terminator-Codons des Gens entwickelt wurde und eine SphI-Schnittstelle hat, kann als ein Primer verwendet werden, der mit der 3'-Region des Gens hybridisiert. Diese Sequenz des Primers NPM-1 ist in der SEQ ID NO:19 des Sequenzprotokolls gezeigt.

**[0089]** Eine im Gen vorhandene BamHI-Schnittstelle würde ein Problem für ein Verfahren darstellen, in dem eine BamHI-Schnittstelle zum Verbinden des Gens der Protease PFUS mit dem 0,3 kb-DNA-Fragment verwendet wird. Die Primer mutRR und mutFR zum Entfernen der BamHI-Schnittstelle durch ein PCR-Mutageneseverfahren können basierend auf der Basensequenz des Gens der Protease PFUS wie gezeigt in der SEQ ID NO:15 des Sequenzprotokolls hergestellt werden. Die Basensequenzen der Primer mutRR und mutFR sind in den SEQ ID NOs:20 bzw. 21 des Sequenzprotokolls gezeigt. Wenn diese Primer zum Entfernen der BamHI-Schnittstelle verwendet werden, wird der durch diese Stelle kodierte Aminosäurerest (d.h. Glycin an Position 560 in der Aminosäuresequenz der Protease PFUS wie gezeigt in der SEQ ID NO:16 des Sequenzprotokolls), aufgrund der in diese Stelle eingefügten Basensubstitution durch Valin ersetzt.

**[0090]** Das Gen der Protease PFUS, das mit dem Promotor und der Signalpeptid-kodierenden Region des Subtilisin E-Gens verbunden werden soll, kann durch Verwendung dieser Primer erhalten werden. Insbesondere werden zwei PCRs unter Verwendung einer chromosomalen DNA von *Pyrococcus furiosus* als Template und des Primerpaares mutRR und NPF-4 oder des Primerpaares mutFR und NPM-1 durchgeführt. Zusätzlich wird eine zweite PCR unter Verwendung eines Heteroduplexes, der durch Vermischen der entsprechenden PCR-amplifizierten DNA-Fragmente gebildet wird, als Template und der Primer NPF-4 und NPM-1 durchgeführt. Folglich kann das gesamte Gen der Protease PFUS mit etwa 2,4 kb amplifiziert werden, ohne dass es eine interne BamHI-Schnittstelle enthält.

**[0091]** Ein DNA-Fragment mit etwa 2,4 kb, das durch Verdau des PCR-amplifizierten DNA-Fragments mit BamHI und SphI erhalten wird, wird isoliert und verwendet, um ein BamHI-SphI-Fragment in dem Plasmid pSNP1 zu ersetzen, das das Gen der Protease PFUS enthält. Ein so hergestellter Expressionsvektor wird als das Plasmid pPS1 bezeichnet. Mit diesem Plasmid transformiertes *Bacillus subtilis* DB 104 wird als *Bacillus subtilis* DB104/pPS1 bezeichnet. Eine Protease-Aktivität wird in sowohl dem Überstand als auch dem Zellextrakt der Kultur dieses Transformanten gefunden, die ähnlich ist zu der, die für den das Plasmid pSNP1 beinhaltenden Transformanten beobachtet wurde. Dies zeigt, dass die Aminosäure-Substitution die enzymatische Aktivität nicht beeinflusst. Die Restriktionsenzym-Karte des Plasmids pPS1 ist in [Fig. 7](#) gezeigt.

**[0092]** Das DNA-Fragment von etwa 0,3 kb, das den Promotor und die Signalpeptid-kodierende Region des Subtilisin E-Gens enthält, wird mit EcoRI und BamHI verdaut und verwendet, um das EcoRI-BamHI-Fragment, das den Promotor P43 und eine Ribosom-Bindestelle enthält, in dem Plasmid pPS1 zu ersetzen. Ein so hergestelltes Expressionsplasmid wird als pNAPS1 bezeichnet. Mit diesem Plasmid transformiertes *Bacillus subtilis* DB 104 wird als *Bacillus subtilis* DB 104/pNAPS1 bezeichnet. Eine thermostabile Protease-Aktivität wird sowohl im Überstand als auch im Zellextrakt der Kultur des Transformanten gefunden, wobei der Expressionsgrad verglichen mit dem von *Bacillus subtilis* DB104/pSNP1 erhöht ist. Die Restriktionsenzym-Karte des Plas-

mids pNAPS1 ist in [Fig. 8](#) gezeigt.

**[0093]** Die von dem Transformanten exprimierte Protease weist enzymatische Eigenschaften auf, die äquivalent zu denen der durch *Bacillus subtilis* DB104/pSNP1 exprimierten Protease wie vorstehend beschrieben sind. Die durch den Transformanten exprimierte Protease wurde gereinigt. Die Analyse der N-terminalen Aminosäuresequenz der gereinigten Protease lieferte die Aminosäuresequenz wie gezeigt in der SEQ ID NO:22 des Sequenzprotokolls. Diese Sequenz ist identisch mit der Sequenz von Position 133 bis Position 144 der Aminosäuresequenz der Protease PFUS wie gezeigt in der SEQ ID NO:15 des Sequenzprotokolls, was zeigt, dass die vollprozessierte Protease PFUS ein Enzym ist, das aus einem Polypeptid besteht, das an dieser Position startet. Die aufgrund dieser Ergebnisse angenommene Aminosäuresequenz der vollprozessierten Protease PFUS ist in der SEQ ID NO:4 des Sequenzprotokolls gezeigt.

**[0094]** Obwohl die Menge an durch *Bacillus subtilis* DB 104/pNAPS1 gebildeter Protease im Vergleich mit der Menge der durch *Bacillus subtilis* DB104/pSNP1 (FERM BP-5634) gebildeten Protease erhöht ist, ist eine höhere Produktivität wünschenswert. Es wird erwartet, dass der Expressionsgrad der Protease durch Modifizieren der Verbindung in dem durch pNAPS1 kodierten fusionierten Peptid zwischen dem Signalpeptid des Subtilisins und der Protease PFUS zur Steigerung der Effizienz beim Entfernen des Signalpeptids erhöht wird. Dem Plasmid pNAPS1 wird ein Peptid, das aus den drei Aminosäureresten Ala-Gly-Ser besteht, zwischen den C-terminalen Aminosäurerest des Signalpeptids von Subtilisin E wie gezeigt in der SEQ ID NO:3 des Sequenzprotokolls (Ala) und dem N-terminalen Aminosäurerest der Protease PFUS (Met) eingefügt. Ein Transformant mit erhöhtem Expressionsgrad der Protease kann durch Einführen einer Mutation in die dieses Peptid kodierende DNA in das Plasmid pNAPS1 und durch Untersuchen der Protease-Produktivität des Transformanten, in den das mutierte Plasmid eingefügt wurde, erhalten werden.

**[0095]** Zuerst wird ein mutiertes Plasmid hergestellt, indem der Ser-kodierende Teil in dem 3-Aminosäurepeptid in dem Gen, das das Fusionsprotein, Subtilisin E-Protease PFUS, kodiert, in dem Plasmid pNAPS1 so modifiziert wird, dass die Basensequenz des Teils zwei zufällige Aminosäurereste kodiert. Solch ein mutiertes Plasmid kann mittels PCR hergestellt werden. Zum Beispiel können die Primer SPOF0 und SPOR0 mit Sequenzen, in denen das Ser-kodierende Codon (TCC) durch sechs zufällige Basen substituiert ist (die Basensequenzen der Primer SPOF0 und SPOR0 sind in den SEQ ID NOs:24 bzw. 25 des Sequenzprotokolls gezeigt), und die Primer SUB3 und NPR-10, die basierend auf der Basensequenz um diese Region herum hergestellt worden sind (die Basensequenzen der Primer SUB3 und NPR-10 sind in den SEQ ID NOs:26 bzw. 27 des Sequenzprotokolls gezeigt), zur Durchführung einer PCR zum Erhalten eines DNA-Fragments verwendet werden, in das die beabsichtigte Mutation an der dem Ser-kodierenden Codon (TCC) entsprechenden Stelle eingefügt wurde. Ein mutiertes Plasmid, das das Protease-Gen mit der eingefügten Mutation enthält, kann durch Ersetzen der entsprechenden Region in dem Plasmid pNAPS1 mit dem erhaltenen Fragment erhalten werden.

**[0096]** Ein Transformant mit erhöhtem Expressionsgrad kann dann durch Einführen der so erhaltenen mutierten Plasmide in einen geeigneten Wirt, z.B. *Bacillus subtilis* DB 104, und durch Bestimmen der Menge der durch die Transformanten exprimierten Protease erhalten werden. Der Expressionsgrad der Protease kann durch Bestimmen der Aktivität in der unabhängigen Kultur des isolierten Transformanten bestätigt werden. Alternativ kann ein Transformant mit erhöhtem Expressionsgrad leicht durch Verwenden einer Agarplatte ausgewählt werden, die ein Substrat enthält.

**[0097]** Insbesondere werden die Transformanten, in die die mutierten Plasmide eingefügt worden sind, auf Agarplatten wachsen gelassen, die Magermilch enthalten. Danach werden die Platten bei einer Temperatur inkubiert, bei der die Protease PFUS ihre Aktivität zeigt, z.B. bei 70°C. Magermilch um eine Kolonie eines Transformanten, der eine Protease exprimiert, wird abgebaut und dadurch klar. Der Expressionsgrad der Protease kann aus der Größe des klaren Bereichs abgeschätzt werden.

**[0098]** Einer der so erhaltenen Transformanten, der einen hohen Grad an Protease-Aktivität verglichen mit *Bacillus subtilis* DB104/pNAPS1 exprimiert, wird als *Bacillus subtilis* DB 104/pSPO124 bezeichnet. Das in diesem Transformanten enthaltene Plasmid wurde präpariert (dieses Plasmid wird als pSPO124 bezeichnet). Eine Analyse der Basensequenz des Plasmids zeigte, dass der Ser-kodierende Teil in die Basensequenz GGGAAT geändert wurde, d.h. dass ein Protein durch das Plasmid kodiert wurde, indem Ser in Gly-Asn geändert wurde.

**[0099]** Folglich wurde bewiesen, dass der Expressionsgrad des Proteins von Interesse in einem Bakterium der Gattung *Bacillus* als Wirt dadurch erhöht werden kann, dass ein Peptid, das aus den vier Aminosäureresten

Ala-Gly-Gly-Asn besteht, downstream des Signalpeptids eines Subtilisins platziert wird, es an den N-Terminus des Proteins von Interesse fusioniert wird und das fusionierte Protein exprimiert wird. Zusätzlich zu Subtilisin E (von *Bacillus subtilis*), das in der vorliegenden Erfindung verwendet wird, sind Subtilisin BPN' von *Bacillus amyloliquefaciens* (Nucl. Acids Res., 11:7911-7925 (1983)), Subtilisin Carlsberg von *Bacillus licheniformis* (Nucl. Acids Res., 13:8913-8926 (1985)) und dergleichen als Subtilisine bekannt, die durch Bakterien der Gattung *Bacillus* hergestellt werden. Die Signalpeptide von ihnen können vorzugsweise für die vorliegende Erfindung verwendet werden, obwohl ihre Aminosäuresequenzen voneinander leicht variieren. Verschiedene Promotoren, die in einem Bakterium der Gattung *Bacillus* wirken, können anstatt des Promotors des Subtilisin E-Gens verwendet werden, das in der vorliegenden Erfindung zur Expressionskontrolle verwendet wird.

**[0100]** Das zu exprimierende Protein ist nicht eingeschränkt. Es ist möglich, ein Protein durch Gentechnik durch Anwenden der vorliegenden Erfindung stark zu exprimieren, solange das Gen für das Protein verfügbar ist. Es ist offensichtlich, dass die vorliegende Erfindung zur Expression eines Proteins verwendet werden kann, das von einem anderen Organismus als dem Wirt abgeleitet ist, da ein Protein abgeleitet von *Pyrococcus furiosus*, das taxonomisch unterschiedlich von Bakterien der Gattung *Bacillus* ist, stark exprimiert wird. Die vorliegende Erfindung wird bevorzugt zur Herstellung der Protease PFUL, der Protease TCES sowie von Proteasen von *Staphylothermus marinus* und *Thermobacteroides proteoliticus*, die strukturell ähnlich zur Protease PFUS sind, mittels Gentechnik verwendet.

**[0101]** Basierend auf der Homologie mit Subtilisinen wird vermutet, dass die Protease PFUS als ein Vorläufer-Protein mit einem Signalpeptid und einem Pro-Peptid exprimiert wird und dann zur Bildung eines gereiften Enzyms prozessiert wird. Des Weiteren kann basierend auf den Ergebnissen der N-terminalen Aminosäuresequenzanalyse des ausgereiften Protease PFUS-Enzyms angenommen werden, dass das ausgereifte Enzym ein Enzym ist, das aus der Aminosäuresequenz wie in der SEQ ID NO:4 des Sequenzprotokolls gezeigt besteht. Jedoch liegt das Molekulargewicht der gereinigten ausgereiften Protease PFUS bei etwa 45 kDa, was geringer als das für die Aminosäuresequenz berechnete ist. Dies legt nahe, dass die als ein Vorläufer exprimierte Protease PFUS in eine ausgereifte Protease umgewandelt wird, nachdem auch ihr C-terminales Peptid prozessiert wurde.

**[0102]** Wenn das durch die Prozessierung entfernte C-terminale Peptid nicht essentiell für die enzymatische Aktivität oder für die Faltung des Enzymproteins in die richtige Struktur ist, wird erwartet, dass der Expressionsgrad der Protease PFUS auch durch Entfernen der diesen Teil kodierenden Region vom Gen und Exprimieren der Protease erhöht werden kann.

**[0103]** Das Molekulargewicht der ausgereiften, von *Bacillus subtilis* DB104/pNAPS1 erhaltenen Protease PFUS kann präzise, z.B. durch Verwendung eines Massenspektrometers, gemessen werden. Durch das gemessene Molekulargewicht und die N-terminale Aminosäuresequenz der ausgereiften Protease PFUS, die wie vorstehend beschrieben bestimmt wurden, wurde herausgefunden, dass die Protease ein Polypeptid ist, das der Aminosäuresequenz wie gezeigt in der SEQ ID NO:15 des Sequenzprotokolls von Ala bei Position 133 bis Thr bei Position 552 entspricht. Des Weiteren kann ein Plasmid, das die Protease PFUS ohne ein Polypeptid exprimiert, das nicht essentiell für ihre enzymatische Aktivität ist, durch Einführung eines Terminationscodons in der Nähe des Teils hergestellt werden, der Thr an Position 552 im Gen der Protease PFUS enthalten im Plasmid pNAPS1 kodiert. Insbesondere kann ein DNA-Fragment mit einer Basensequenz, in die das beabsichtigte Terminationscodon eingeführt worden ist, mittels PCR unter Verwendung des Primers NPR544, der ein Terminationscodon (TGA) an der C-terminalen Seite des den 544. Aminosäurerest kodierenden Codons aus den vom Initiationscodon im Gen der Protease PFUS im Plasmid pNAPS1 (Ser) einführen kann (die Basensequenz des Primers NPR544 ist in der SEQ ID NO:28 des Sequenzprotokolls gezeigt) und des Primers NPFE81 erhalten werden, der die Basensequenz des Gebiets upstream der NspV-Schnittstelle im Gen aufweist (die Basensequenz des Primers NPFE81 ist in der SEQ ID NO:29 des Sequenzprotokolls gezeigt). Ein mutiertes Plasmid, das das Protease-Gen enthält, in das die Mutation von Interesse eingeführt worden ist, kann durch Ersetzen der entsprechenden Region in dem Plasmid pNAPS1 durch das Fragment erhalten werden. Dieses Plasmid wird als das Plasmid pNAPSΔC bezeichnet. Mit diesem Plasmid transformiertes *Bacillus subtilis* DB 104 wird als *Bacillus subtilis* DB104/pNAPSΔC bezeichnet.

**[0104]** Dieser Transformant exprimiert eine Protease-Aktivität mit Eigenschaften äquivalent zu denen der Protease PFUS und mit einem höheren Expressionsgrad als dem von *Bacillus subtilis* DB104/pNAPS1.

**[0105]** Folglich wurde herausgefunden, dass das im Plasmid pNAPSΔC enthaltene Gen der Protease PFUS eine Region umfasst, die ausreichend für die Expression der Aktivität des Enzyms ist. Die Basensequenz der Region, die in dem Plasmid vorhandene Protease PFUS kodiert, ist in der SEQ ID NO:2 des Sequenzpro-

tokolls gezeigt. Die durch die Basensequenz kodierte Aminosäuresequenz ist in SEQ ID NO:1 des Sequenzprotokolls gezeigt.

**[0106]** Des Weiteren kann die Protease PFUS ohne ihr C-terminales Peptid durch Einführung einer Mutation ähnlich zu der im Plasmid pNAPSΔC in das Gen der Protease PFUS im Plasmid pSP0124 exprimiert werden.

**[0107]** Insbesondere kann das Plasmid von Interesse durch Mischen und Ligieren eines DNA-Fragments von etwa 13 kb erhalten durch Verdau des Plasmids pNAPSΔC mit NspV und SphI mit dem Plasmid pSP0124 hergestellt werden, das mit NspV und SphI verdaut worden ist. Dieses Plasmid wird als das Plasmid pSO124ΔC bezeichnet. Mit diesem Plasmid transformiertes Bacillus subtilis DB 104 wird bezeichnet und gekennzeichnet als Bacillus subtilis DB 104/pSO124ΔC und wurde am 16. Mai 1997 (Datum der ursprünglichen Hinterlegung) gemäß dem Budapester Vertrag am Nationalen Institut für Biowissenschaften und Humantechnologie, Amt für Industrielle Wissenschaft und Technologie, Ministerium für Internationalen Handel und Industrie, 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japan unter der Zugriffsnummer FERM BP-6294 hinterlegt. Der Expressionsgrad der Protease ist in dieser Transformante verglichen mit dem von Bacillus subtilis DB104/pNAPS1 erhöht.

**[0108]** Die enzymatischen Eigenschaften sowie die physikalischen und chemischen Eigenschaften der durch die Transformanten Bacillus subtilis DB104/pNAPSΔC und Bacillus subtilis DB 104/pSPO124ΔC hergestellten Proteasen scheinen identisch mit denen der durch Bacillus subtilis DB104/pSNP1 hergestellten Protease zu sein. Die Haupteigenschaften der von den Kulturen der zwei Transformanten erhaltenen Proteasen sind wie folgt:

(1) Aktivität:

**[0109]** Baut Casein und Gelatine unter Bildung kurzkettiger Polypeptide ab.

**[0110]** Hydrolysiert Succinyl-L-leucyl-L-leucyl-L-valyl-L-tyrosin-4-methylcoumarin-7-amid (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA) unter Bildung einer fluoreszierenden Substanz (7-Amino-4-methylcoumarin).

**[0111]** Hydrolysiert Succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-prolyl-L-phenylalanin-p-nitroanild (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-p-NA) unter Bildung einer gelben Substanz (p-Nitroanilin).

(2) Optimale Temperatur:

**[0112]** Weist eine enzymatische Aktivität bei 40-110°C mit einer optimalen Temperatur bei 80-95°C auf.

(3) Optimaler pH-Wert:

**[0113]** Weist eine enzymatische Aktivität bei pH 5-10 mit einem optimalen pH-Wert bei 6-8 auf.

(4) Thermostabilität:

**[0114]** Behält 90% oder mehr ihrer enzymatischen Aktivität nach Behandlung bei 95°C für 8 Stunden.

(5) pH-Stabilität:

**[0115]** Behält 95% oder mehr ihrer Aktivität nach Behandlung bei pH 5-11 bei 95°C für 60 Minuten.

(6) Molekulargewicht:

**[0116]** Weist ein Molekulargewicht von etwa 45 kDa auf einer SDS-PAGE auf.

**[0117]** Folglich werden Proteasen mit hoher Thermostabilität und Gene davon bereitgestellt. Auch wird durch die vorliegende Erfindung ein neues System zur Expression eines Proteins offenbart, das die Expression der Protease in hohen Mengen ermöglicht. Das Expressionssystem ist für die Herstellung der erfindungsgemäßen Protease sowie von verschiedenen Proteinen durch Gentechnik geeignet.

**[0118]** Die folgenden Beispiele veranschaulichen die vorliegende Erfindung genauer, sind aber nicht beschränkend aufzufassen.

## Beispiel 1

(1) Herstellung einer chromosomalen DNA von *Pyrococcus furiosus*

**[0119]** *Pyrococcus furiosus* DSM3638 wurde wie folgt kultiviert.

**[0120]** Ein Medium mit 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% löslicher Stärke, 3,5% Jamarine S Feststoff (Jamarine Laboratory), 0,5% Jamarine S Flüssigkeit (Jamarine Laboratory), 0,003%  $\text{MgSO}_4$ , 0,001%  $\text{NaCl}$ , 0,0001%  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,0001%  $\text{CoSO}_4$ , 0,0001%  $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,0001%  $\text{ZnSO}_4$ , 0,1 ppm  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 ppm  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,1 ppm  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ , 0,1 ppm  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  und 0,25 ppm  $\text{NiCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  wurde in eine 2 l-Mediumflasche gegeben und bei 120°C für 20 Minuten sterilisiert. Stickstoffgas wurde zur Entfernung von gelöstem Sauerstoff hindurchgeleitet und dann wurde das Medium mit dem Bakterienstamm angeimpft und bei 95°C für 16 Stunden ohne Schütteln kultiviert. Nach dem Kultivieren wurden die Zellen durch Zentrifugieren gesammelt.

**[0121]** Die erhaltenen Zellen wurden dann in 4 ml 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) mit 25% Sucrose aufgenommen. 2 ml 0,2 M EDTA und 0,8 ml Lysozym (5 mg/ml) wurden zu der Suspension zugegeben. Das Gemisch wurde eine Stunde bei 20°C inkubiert. 24 ml SET-Lösung (150 mM  $\text{NaCl}$ , 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0), 4 ml 5% SDS und 400  $\mu\text{l}$  Proteinase K (10 mg/ml) wurden dem Gemisch zugeführt. Dieses wurde für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Extrahieren des Gemisches mit Phenol-Chloroform beendet. Dann wurde eine Ethanol-fällung zum Erhalten von etwa 3,2 mg der chromosomalen DNA durchgeführt.

## Beispiel 2

## (1) Synthese der Primer zum Herstellen des Plasmids pNSP1

**[0122]** Zur Synthese von Primern, die zur Amplifizierung des gesamten Gens der Protease PFUS verwendet werden, wurde das Plasmid pNSP1, das das gesamte Gen enthält, von *Bacillus subtilis* DB104/pNSP1 (FERM BP-5634) isoliert und die Basensequenz der benötigten Region wurde bestimmt. Basierend auf der Basensequenz wurden der Primer NPF-4 zum Einfügen einer BamHI-Schnittstelle direkt upstream des Initiationscodons des Gens der Protease PFUS und der Primer NPM-1 synthetisiert, der mit der 3'-Region des Gens hybridisiert und eine Erkennungsstelle für SphI enthält. Die Basensequenzen der Primer NPF-4 und NPM-1 sind in den SEQ ID NOs:13 bzw. 19 des Sequenzprotokolls gezeigt.

**[0123]** Die Primer mutRR und mutFR zum Entfernen der etwa 1,7 kb downstream des Initiationscodons im Gen der Protease PFUS vorhandenen BamHI-Schnittstelle wurden auch synthetisiert. Die Basensequenzen der Primer mutRR und mutFR sind in den SEQ ID NOs:20 bzw. 21 des Sequenzprotokolls gezeigt.

## (2) Herstellung des Plasmids pPS1

**[0124]** Zwei Sätze der LA-PCR-Reaktionsgemische, von denen jedes eine chromosomale DNA von *Pyrococcus furiosus* als Template und eine Kombination der Primer NPF-4 und mutRR oder eine Kombination der Primer mutFR und NPM-1 enthält, wurden hergestellt und 30 Reaktionszyklen von 94°C für 30 Sekunden-55°C für 1 Minute-68°C für 3 Minuten unterworfen. LA-PCR-Kit Ver. 2 (Takara Shuzo) wurde zum Herstellen der LA-PCR-Reaktionsgemische verwendet. Aliquots der Reaktionsgemische wurden einer Agarose-Gel-Elektrophorese unterworfen und die Amplifizierung eines DNA-Fragments von etwa 1,8 kb mit den Primern NPF-4 und mutRR bzw. eines DNA-Fragments von etwa 0,6 kb mit den Primern mutFR und NPM-1 wurde beobachtet.

**[0125]** Die Primer wurden von den zwei PCR-Reaktionsgemischen unter Verwendung von SUPREC-02 (Takara Shuzo) zur Herstellung amplifizierter DNA-Fragmente entfernt. Ein LA-PCR-Reaktionsgemisch, das diese zwei amplifizierten DNA-Fragmente aber nicht die Primer oder LA-Taq enthielt, wurde hergestellt, 10 Minuten bei 94°C Hitzedenaturiert, innerhalb von 30 Minuten auf 30°C abgekühlt und dann 15 Minuten bei 30°C zur Bildung eines Heterokomplexes inkubiert. Danach wurde LA-Taq (Takara Shuzo) zu dem Reaktionsgemisch für eine Reaktion bei 72°C für 30 Minuten zugegeben. Die Primer NPF-4 und NPM-1 wurden dann zu dem Reaktionsgemisch zugegeben, das dann 25 Reaktionszyklen bei 94°C für 30 Sekunden-55°C für 1 Minute-68°C für 3 Minuten unterworfen wurde. Amplifizierung eines DNA-Fragments von etwa 2,4 kb wurde in dem Reaktionsgemisch beobachtet.

**[0126]** Das DNA-Fragment von etwa 2,4 kb wurde mit BamHI und SphI (beide vom Takara Shuzo) verdaut. Das Fragment wurde mit dem Plasmid pNSP1, das zur Entfernung des gesamten Gens der Protease PFUS mit BamHI und SphI verdaut worden ist, gemischt und ligiert und dann in *Bacillus subtilis* DB 104 eingeführt.

Plasmide wurden von erhaltenen Kanamycin-resistenten Transformanten präpariert. Ein Plasmid, in das nur ein Molekül des Fragments von etwa 2,4 kb inseriert wurde, wurde ausgewählt und als das Plasmid pPS1 bezeichnet. Mit diesem Plasmid pPS1 transformiertes *Bacillus subtilis* DB104 wurde als *Bacillus subtilis* DB104/pPS1 bezeichnet.

**[0127]** Die Restriktionsenzym-Karte des Plasmids pPS1 ist in [Fig. 7](#) gezeigt.

(3) Amplifizierung eines DNA-Fragments für die Promotor-Signalpeptid-kodierende Region des Gens von Subtilisin E

**[0128]** Primer zum Erhalten der Promotor-Signalpeptid-kodierenden Region des Gens von Subtilisin E wurden synthetisiert. Zuerst wurde der Primer SUB4 basierend auf der Basensequenz der Promotor-Region des Gens von Subtilisin E wie beschrieben in J. Bacteriol., 171:2657-2665 (1989) synthetisiert, der mit der Sequenz upstream dieser Region hybridisiert und eine EcoRI-Schnittstelle enthält (die Basensequenz des Primers SUB4 ist in der SEQ ID NO:17 des Sequenzprotokolls gezeigt). Der Primer BmR1, der eine BamHI-Schnittstelle direkt downstream der Signalpeptid-kodierenden Region einfügen kann, wurde basierend auf der Basensequenz des Gens von Subtilisin E wie beschrieben in J. Bacteriol., 158:411-418 (1984) synthetisiert (die Basensequenz des Primers BmR1 ist in der SEQ ID NO:18 des Sequenzprotokolls gezeigt).

**[0129]** Ein PCR-Reaktionsgemisch, das das Plasmid pKWZ, das das Gen von Subtilisin E wie beschrieben in J. Bacteriol., 171:2657-2665 enthält, als Template und die Primer SUB4 und BmR1 enthält, wurde hergestellt und 30 Reaktionszyklen von 94°C für 30 Sekunden-55°C für 1 Minute-68°C für 2 Minuten unterworfen. Ein Aliquot des Reaktionsgemisches wurde einer Agarose-Gel-Elektrophorese unterworfen und die Amplifikation eines DNA-Fragments von etwa 0,3 kb wurde beobachtet.

(4) Herstellung des Protease-Expressionsplasmids pNAPS1

**[0130]** Das DNA-Fragment von etwa 0,3 kb wie vorstehend beschrieben wurde mit EcoRI (Takara Shuzo) und BamHI verdaut, mit dem in Beispiel 3 beschriebenen Plasmid pPS1, das mit EcoRI und BamHI verdaut wurde, gemischt und ligiert und dann in *Bacillus subtilis* DB 104 eingeführt. Von den erhaltenen Kanamycin-resistenten Transformanten wurden Plasmide präpariert. Ein Plasmid, in das nur ein Molekül des Fragments von etwa 0,3 kb inseriert war, wurde ausgewählt und als das Plasmid pNAPS1 bezeichnet. Mit dem Plasmid pNAPS1 transformiertes *Bacillus subtilis* DB 104 wurde als *Bacillus subtilis* DB 104/pNAPS1 bezeichnet.

**[0131]** Die Restriktionsenzym-Karte des Plasmids pNAPS1 ist in [Fig. 8](#) gezeigt.

(5) Herstellung des Plasmids pSNP2

**[0132]** Der Primer SUB17R zur Einführung einer BamHI-Schnittstelle upstream der Signalpeptid-kodierenden Region des Gens von Subtilisin E in dem vorstehend genannten Plasmid pNAPS1 wurde synthetisiert (die Basensequenz des Primers SUB17R ist in der SEQ ID NO:23 des Sequenzprotokolls gezeigt). Ein PCR-Reaktionsgemisch, das das Plasmid pNAPS1 als Template und die Primer SUB17R und SUB4 enthält, wurde hergestellt und 25 Reaktionszyklen von 94°C für 30 Sekunden-55°C für 1 Minute-72°C für 1 Minute unterworfen. Das amplifizierte DNA-Fragment von etwa 0,21 kb wurde mit EcoRI und BamHI zum Erhalten eines DNA-Fragments von etwa 0,2 kb verdaut, das den Promotor und die SD-Sequenz des Gens von Subtilisin E enthält. Dieses Fragment wurde mit dem Plasmid pNAPS1, das mit EcoRI und BamHI verdaut worden war, gemischt und ligiert. Das Reaktionsgemisch wurde zur Transformierung von *Bacillus subtilis* DB 104 verwendet. Von erhaltenen Kanamycin-resistenten Transformanten wurden Plasmide präpariert. Ein Plasmid, in das das DNA-Fragment von etwa 0,2 kb inseriert war, wurde ausgewählt und als das Plasmid pSNP2 bezeichnet.

(6) Bildung eines mutierten Plasmids, das eine Protease stark exprimiert

**[0133]** Die Primer SPOF0 und SPOR0 zum Ersetzen der Sequenz, die den Aminosäurerest Ser (Basensequenz: TCC) an der Verbindung zwischen der Signalpeptid-kodierenden Region des Gens von Subtilisin E in dem Plasmid pNAPS1 und dem Initiationscodon des Gens der Protease PFUS kodiert, mit einer Sequenz für zwei zufällige Aminosäurereste, wurden synthetisiert (die Basensequenzen der Primer SPOF0 und SPOR0 sind in den SEQ ID NOs: 24 bzw. 25 des Sequenzprotokolls gezeigt). Der Primer SUB3 zum Einführen einer BamHI-Schnittstelle direkt upstream der Signalpeptid-kodierenden Region im Gen von Subtilisin E im Plasmid pNAPS1 und der Primer NPR-10, der eine SpeI-Schnittstelle in der Protease PFUS-kodierenden Region enthält, wurden synthetisiert (die Basensequenzen der Primer SUB3 und NPR-10 sind in den SEQ ID NOs: 26

bzw. 27 des Sequenzprotokolls gezeigt).

**[0134]** PCR-Reaktionsgemische, von denen jedes das Plasmid pNAPS1 als Template und eine Kombination der Primer SPOF0 und NPR-10 oder eine Kombination der Primer SUB3 und SPOR0 enthielt, wurden hergestellt und 20 Reaktionszyklen von 94°C für 30 Sekunden-50°C für 1 Minute-72°C für 1 Minute unterworfen. Die in den zwei Reaktionsgemischen amplifizierten DNA-Fragmente von etwa 0,13 kb und etwa 0,35 kb wurden zusammengemischt, 10 Minuten bei 94°C denaturiert und schrittweise auf 37°C zum Bilden eines Heteroduplexes abgekühlt. Von den Heteroduplexen wurde dann eine doppelsträngige DNA mittels Taq-Polymerase (Takara Shuzo) gebildet. Ein PCR-Reaktionsgemisch, das die so erhaltene doppelsträngige DNA als Template und die Primer SUB3 und NPR-10 enthielt, wurde hergestellt und 25 Reaktionszyklen von 94°C für 30 Sekunden-50°C für 1 Minute-72°C für 1 Minute unterworfen. Ein DNA-Fragment, das durch Verdau des amplifizierten DNA-Fragments von etwa 0,43 kb mit BamHI und SpeI (Takara Shuzo) erhalten wurde, wurde mit dem Plasmid pSNP2, das mit BamHI und SpeI verdaut worden war, gemischt und ligiert. Das Reaktionsgemisch wurde zum Transformieren von *Bacillus subtilis* DB 104 verwendet.

**[0135]** Erhaltene Kanamycin-resistente Transformanten wurden auf Magermilchplatten (LB-Agarmedium zur Hochtemperatur-Kultivierung mit 10 µg/ml Kanamycin und 1% Magermilch) zur Bildung von Kolonien überimpft. Danach wurden die Platten bei 70°C inkubiert und die durch die entsprechenden Transformanten exprimierten Protease-Aktivitäten wurden basierend auf dem Grad des Abbaus der Magermilch um die Kolonien untersucht. Als ein Ergebnis wurde ein Klon isoliert, der eine besonders hohe Aktivität aufwies, und ein Plasmid, das als das Plasmid pSP0124 bezeichnet wurde, wurde von diesem Klon präpariert. Mit diesem Plasmid transformiertes *Bacillus subtilis* DB104 wurde als *Bacillus subtilis* DB104/pSPO124 bezeichnet. Die Basensequenz des Plasmids pSP0124 wurde analysiert und es wurde herausgefunden, dass die Basensequenz, die Ser in dem Plasmid pNAPS1 kodiert, durch die Basensequenz GGGAAT ausgetauscht wurde, d.h. dass ein Protein kodiert wurde, indem Ser durch die beiden Aminosäurereste Gly-Asn ausgetauscht worden war. Zusätzlich zeigte sich, dass das Pro (CCA) entsprechende 25. Codon ab dem Initiationscodon des Gens der Protease PFUS in ein Leu (CTA)-kodierendes Codon gleichzeitig mit der vorstehend beschriebenen Mutation geändert wurde.

#### (7) Herstellung des Protease-Expressionsplasmids pNAPSΔC

**[0136]** Ein Terminationscodon wurde auf der C-terminalen Seite des 544. Aminosäurerestes ab dem Initiationscodon des Gens der Protease PFUS in dem Plasmid pNAPS1 zur Herstellung eines Plasmids eingeführt, das eine Protease exprimiert, der der Teil downstream dieser Stelle fehlt. Der Primer NPR544 wurde synthetisiert, der ein Terminationscodon (Basensequenz: TGA) an der C-terminalen Seite des den 544. Aminosäurerest kodierenden Codons in das Gen einführt und eine SphI-Schnittstelle hat (die Basensequenz des Primers NPR544 ist in der SEQ ID NO:28 des Sequenzprotokolls gezeigt). Zusätzlich wurde der Primer NPFE81 basierend auf der Basensequenz des Teils upstream der NspV-Schnittstelle im Gen synthetisiert (die Basensequenz des Primers NPFE81 ist in der SEQ ID NO:29 des Sequenzprotokolls gezeigt).

**[0137]** Ein PCR-Reaktionsgemisch, das das Plasmid pNAPS1 als Template und die Primer NPFE81 und NPR544 enthielt, wurde hergestellt und 20 Reaktionszyklen von 94°C für 30 Sekunden-50°C für 1 Minute-72°C für 1 Minute unterworfen. Das amplifizierte DNA-Fragment von etwa 0,61 kb wurde mit NspV (Takara Shuzo) und SpeI zum Erhalt eines das Terminationscodon enthaltenden DNA-Fragments von etwa 0,13 kb verdaut. Dieses DNA-Fragment wurde mit dem Plasmid pNAPS1, das mit den Restriktionsenzymen NspV und SphI verdaut worden war, gemischt und ligiert. Das Reaktionsgemisch wurde zum Transformieren von *Bacillus subtilis* DB 104 verwendet. Von den erhaltenen Kanamycin-resistenten Transformanten wurden Plasmide präpariert. Ein Plasmid, in das das DNA-Fragment von etwa 0,13 kb inseriert war, wurde ausgewählt und als das Plasmid pNAPSΔC bezeichnet. Mit dem Plasmid pNAPSΔC transformiertes *Bacillus subtilis* DB 104 wurde als *Bacillus subtilis* DB104/pNAPSΔC bezeichnet.

#### (8) Herstellung des Protease-Expressionsplasmids pSPO124ΔC

**[0138]** Ein DNA-Fragment von etwa 1,3 kb, das durch Verdau des Plasmids pNAPSΔC mit NspV und SphI erhalten wurde, wurde isoliert und dann mit dem Plasmid pSP0124, das mit NspV und SphI verdaut worden war, vermischt und ligiert. Das Reaktionsgemisch wurde zum Transformieren von *Bacillus subtilis* DB 104 verwendet. Von den erhaltenen Kanamycin-resistenten Transformanten wurden Plasmide präpariert. Ein Plasmid, in das das DNA-Fragment von etwa 1,3 kb inseriert war, wurde ausgewählt und als das Plasmid pSPO124ΔC bezeichnet. Mit dem Plasmid pSPO124ΔC transformiertes *Bacillus subtilis* DB 104 wurde als *Bacillus subtilis* DB 104/pSPO124ΔC bezeichnet.

## Beispiel 3

(1) Kultivieren von mit einem das Gen der Protease PFUS enthaltenden Plasmids transformiertem *Bacillus subtilis* und Herstellen einer ungereinigten Enzymlösung

**[0139]** *Bacillus subtilis* DB104/pNAPS1, welches *Bacillus subtilis* DB104 ist, in das das das Gen der Protease PFUS enthaltene Plasmid pNAPS1 wie beschrieben in Beispiel 2 eingefügt wurde, wurde 24 Stunden bei 37°C in 2 ml LB-Medium (Trypton 10 g/l, Hefeextrakt 5 g/l, NaCl 5 g/l, pH 7,2) mit 10 µg/ml Kanamycin kultiviert. Die Kultur wurde zum Erhalten eines Kulturüberstandes (Präparat 1-S) und von Zellen zentrifugiert.

**[0140]** Die Zellen wurden in 100 µl 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 aufgenommen und 45 Minuten bei 37°C nach Zugabe von 2 mg Lysozym (Sigma) verdaut. Die verdaute Probe wurde 10 Minuten bei 95°C Hitze-behandelt und dann wurde ein Überstand durch Zentrifugation zum Erhalten eines zellfreien Extrakts (Präparat 1-L) gesammelt.

**[0141]** In ähnlicher Weise wurden Kulturüberstände und zellfreie Extrakte von das Plasmid pSPO124 enthaltendem *Bacillus subtilis* DB104/pSPO124, das Plasmid pNAPSΔC enthaltendem *Bacillus subtilis* DB104/pNAPSΔC oder das Plasmid pSPO124ΔC enthaltendem *Bacillus subtilis* DB104/pSPO124ΔC erhalten. Der Kulturüberstand und der zellfreie Extrakt von *Bacillus subtilis* DB104/pSPO124 wurden als 124-S bzw. 124-L bezeichnet. Der Kulturüberstand und der zellfreie Extrakt von *Bacillus subtilis* DB104/pNAPSΔC wurden als ΔC-S bzw. ΔC-L bezeichnet. Der Kulturüberstand und der zellfreie Extrakt von *Bacillus subtilis* DB104/pSPO124ΔC wurden als 124ΔC-S bzw. 124ΔC-L bezeichnet. Protease-Aktivitäten wurden mit diesen Präparaten bestimmt und die Konzentration der in jedem Präparat enthaltenen Protease wurde bestimmt.

(2) Vergleich der Protease-Produktivitäten

**[0142]** Die Aktivität der Protease PFUS wurde durch spektroskopisches Messen der Menge an p-Nitroanilin bestimmt, das in einer enzymatischen Hydrolysereaktion unter Verwendung von Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-p-NA (Sigma) als Substrat gebildet wurde. Kurz zusammengefasst wurde ein auf seine enzymatische Aktivität zu messendes Enzympräparat geeignet verdünnt. 50 µl 1 mM Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-p-NA-Lösung in 100 mM Phosphatpuffer, pH 7,0, wurden zu 50 µl der verdünnten Probenlösung gegeben. Dann erfolgte die Reaktion für 30 Minuten bei 95°C. Nach Beendigung der Reaktion durch Abkühlen auf Eis wurde die Absorption bei 405 nm zum Berechnen der Menge an gebildetem p-Nitroanilin gemessen. Eine Unit des Enzyms wurde als die Menge des Enzyms definiert, die 1 µmol p-Nitroanilin pro 1 Minute bei 95°C bildete. Die Menge des in dem Kulturüberstand oder den Zellen exprimierten Enzymproteins wurde basierend auf der gemessenen enzymatischen Aktivität unter der Annahme berechnet, dass die spezifische Aktivität bei 9,5 Units/mg Protein der Protease PFUS liegt.

**[0143]** Die Protease-Aktivität von jedem im Beispiel 3-(1) hergestellten Enzympräparat wurde gemessen. Die aus den Messungen berechnete Produktivität an Protease PFUS pro 1 l Kultur jedes Transformanten ist in Tabelle 1 gezeigt.

**[0144]** Im *Bacillus subtilis* DB 104/pSPO124 erhöhte sich die Produktivität an Protease PFUS in den Zellen um 3,6-fach verglichen mit der von *Bacillus subtilis* DB104/pNAPS1. In *Bacillus subtilis* DB104/pNAPSΔC erhöhte sich die Produktivität an Protease PFUS im Zellüberstand um 2,4-fach bzw. in den Zellen um 2,2-fach. Auch in *Bacillus subtilis* DB104/pSPO124ΔC erhöhte sich die Produktivität an Protease PFUS im Kulturüberstand um 2-fach bzw. in den Zellen um 2,4-fach. Die Produktivität pro Zelle erhöhte sich auch.

**[0145]** Die Gesamtmenge an im Zellüberstand und den Zellen hergestellter Protease PFUS erhöhte sich um 2,1-fach bei *Bacillus subtilis* DB 104/pSPO124, um 2,1-fach bei *Bacillus subtilis* DB104/pNAPSΔC bzw. um 2,2-fach bei *Bacillus subtilis* DB104/pSPO124ΔC verglichen zu der von *Bacillus subtilis* DB104/pNAPS1.

Tabelle 1

Die Produktivität an Protease PFUS (mg/l der Kultur)

Transformante (Plasmid)	Kulturüberstand	Zellen	Kulturüberstand + Zellen
pNAPS1	15,1	12,5	27,6
pSPO124	13,1	45,4	58,5
pNAPSΔC	35,5	28,1	63,6
pSPO124ΔC	30,5	30,1	60,6

Beispiel 4

## (1) Herstellen von gereinigtem Enzympräparat der ausgereiften Protease PFUS

**[0146]** *Bacillus subtilis* DB104/pNAPS1 und *Bacillus subtilis* DB104/pSPO124ΔC, die beide *Bacillus subtilis* DB 104 sind, in die das Gen der erfindungsgemäßen hyperthermostabilen Protease wie beschrieben in Beispiel 2 eingeführt wurde, wurden getrennt voneinander in 5 ml LB-Medium mit 10 µg/ml Kanamycin überimpft und unter Schütteln 7 Stunden bei 37°C kultiviert. Die 5 ml-Kulturen wurden in 500 ml TM-Medium (Sojabohnenpulver 5 g/l, Polypepton 10 g/l, Fleischextrakt 5 g/l, Hefeextrakt 2 g/l, Glucose 10 g/l, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10 mg/l, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 10 mg/l, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 mg/l, pH 7,0) mit 10 µg/ml Kanamycin in 5 l-Erlenmeyerkolben überimpft und unter Schütteln 3 Tage bei 30°C kultiviert. Die erhaltenen Kulturen wurden mit Ultraschall aufgeschlossen, 30 Minuten bei 95°C Hitze-behandelt und dann zum Sammeln des Überstands zentrifugiert. Zu den Überständen wurde Ammoniumsulfat bis 25% Sättigung gegeben. Die durch nachfolgende Zentrifugation erhaltenen Überstände wurden dann auf Micro-Prep Methyl-HIC-Säulen (Bio-Rad) aufgetragen, die mit 25 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,6) mit 25% gesättigtem Ammoniumsulfat äquilibriert waren. Nach Waschen des Gels mit dem gleichen Puffer wurde die an die Säulen adsorbierte Protease PFUS durch schrittweise Elution unter Verwendung von 25 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,6) mit 40% Ethanol eluiert. Die so erhaltenen, die Protease PFUS enthaltenen Fraktionen wurden einer Gelfiltration unter Verwendung von NAP-25-Säulen (Pharmacia), äquilibriert mit 0,05% Trifluoressigsäure mit 20% Acetonitril, unterworfen und während Denaturieren der Protease PFUS entsalzt. Dann wurden gereinigte Präparate der Protease PFUS erhalten. Die von *Bacillus subtilis* DB104/pNAPS1 und *Bacillus subtilis* DB 104/pSPO124ΔC erhaltenen Präparate wurden als NAPS-1 bzw. SPO-124ΔC bezeichnet.

**[0147]** Eine Elektrophorese von beiden gereinigten Enzympräparaten auf einem 0,1% SDS-10% Polyacrylamidgel mit nachfolgender Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue R-250 zeigte einzelne Banden für die beiden gereinigten Enzympräparate NAPS-1 und SPO-124ΔC mit einem abgeschätzten Molekulargewicht von etwa 45 kDa.

## (2) Analyse der N-terminalen Aminosäuresequenz der ausgereiften Protease PFUS

**[0148]** N-terminale Aminosäuresequenzen der gereinigten Enzympräparate NAPS-1 und SPO-124ΔC wurden durch ein automatisiertes Edman-Verfahren unter Verwendung eines G 1000A-Proteinsequenzers (Hewlett-Packard) analysiert. Beide N-terminalen Aminosäuresequenzen der zwei gereinigten Enzympräparate waren wie in der SEQ ID NO:22 des Sequenzprotokolls gezeigt. Diese Sequenz stimmt mit der Sequenz N-terminale Aminosäuresequenzen der gereinigten Enzympräparate NAPS-1 und SPO-124ΔC wurden durch ein automatisiertes Edman-Verfahren unter Verwendung eines G 1000A-Proteinsequenzers (Hewlett-Packard) analysiert. Beide N-terminalen Aminosäuresequenzen der zwei gereinigten Enzympräparate waren wie in der SEQ ID NO:22 des Sequenzprotokolls gezeigt. Diese Sequenz stimmt mit der Sequenz von Position 133 bis Position 144 der Aminosäuresequenz der Protease PFUS wie in der SEQ ID NO:15 des Sequenzprotokolls gezeigt überein. Dies zeigt, dass sowohl NAPS-1 als auch SPO-124ΔC Enzyme sind, die aus einem von diesem Teil startenden Polypeptid bestehen.

## (3) Massenspektrometrische Analyse der ausgereiften Protease PFUS

**[0149]** Eine massenspektrometrische Analyse der gereinigten Enzympräparate NAPS-1 und SPO-124ΔC wurde unter Verwendung eines API300-Quadrupoldreifachmassenspektrometers (Perkin-Elmer Sciex) durchgeführt. Basierend auf dem abgeschätzten Molekulargewicht von NAPS-1, 43 744 Da, wurde gezeigt, dass die

durch *Bacillus subtilis* DB104/pNAPS1 hergestellte ausgereifte Protease PFUS ein Enzym ist, das aus einem Polypeptid von Ala an Position 133 bis Thr an Position 552 der Aminosäuresequenz der Protease PFUS wie in der SEQ ID NO:15 des Sequenzprotokolls gezeigt besteht. Des Weiteren wurde basierend auf dem abgeschätzten Molekulargewicht von SPO-124ΔC, 42 906 Da gezeigt, dass die durch *Bacillus subtilis* DB104/pSPO124ΔC hergestellte ausgereifte Protease PFUS ein Enzym ist, das aus einem Polypeptid von Ala an Position 133 bis Ser an Position 544 der Aminosäuresequenz der Protease PFUS wie in der SEQ ID NO:15 des Sequenzprotokolls gezeigt, d.h. die Aminosäuresequenz wie in der SEQ ID NO:2 des Sequenzprotokolls gezeigt, besteht.

## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: Takara Shuzo Co., Ltd.
- (B) STRASSE: 609, Takenaka-cho, Fushimi-ku, Kyoto-shi
- (C) ORT: Kyoto
- (E) LAND: Japan
- (F) POSTLEITZAHL (ZIP): 612

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: SYSTEM ZUM EXPRIMIEREN EINES  
HYPERTHERMOSTABILEN PROTEINS

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 29

## (iv) COMPUTERLESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM-PC-kompatibel
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPO)

## (v) DATEN DER JETZIGEN ANMELDUNG:

- (A) ANMELDENUMMER: PCT/JP98/02465
- (B) ANMELDETAG: 4. Juni 1998

## (vi) DATEN DER VORANMELDUNG:

- (A) ANMELDENUMMER: JP 9/151969
- (B) ANMELDETAG: 10. Juni 1997

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:1:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN

- (A) LÄNGE: 412
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:1:

Ala	Glu	Leu	Glu	Gly	Leu	Asp	Glu	Ser	Ala	Ala	Gln	Val	Met	Ala
				5					10					15
Thr	Tyr	Val	Trp	Asn	Leu	Gly	Tyr	Asp	Gly	Ser	Gly	Ile	Thr	Ile
				20					25					30
Gly	Ile	Ile	Asp	Thr	Gly	Ile	Asp	Ala	Ser	His	Pro	Asp	Leu	Gln
				35					40					45
Gly	Lys	Val	Ile	Gly	Trp	Val	Asp	Phe	Val	Asn	Gly	Arg	Ser	Tyr
				50					55					60
Pro	Tyr	Asp	Asp	His	Gly	His	Gly	Thr	His	Val	Ala	Ser	Ile	Ala
				65					70					75
Ala	Gly	Thr	Gly	Ala	Ala	Ser	Asn	Gly	Lys	Tyr	Lys	Gly	Met	Ala
				80					85					90
Pro	Gly	Ala	Lys	Leu	Ala	Gly	Ile	Lys	Val	Leu	Gly	Ala	Asp	Gly
				95					100					105
Ser	Gly	Ser	Ile	Ser	Thr	Ile	Ile	Lys	Gly	Val	Glu	Trp	Ala	Val
				110					115					120
Asp	Asn	Lys	Asp	Lys	Tyr	Gly	Ile	Lys	Val	Ile	Asn	Leu	Ser	Leu
				125					130					135





```

TCAGATGGTA CTGACGCTCT AAGTCAGGCT GTTAATGCAG CGTGGGATGC TGGATTAGTT 480
GTTGTGGTTG CCGCTGGAAA CAGTGGACCT AACCAAGTATA CAATCGGTTT TCCAGCAGCT 540
GCAAGCAAAG TTATTACAGT TGGAGCCGTT GACAAGTATG ATGTTATAAC AAGCTTCTCA 600
AGCAGAGGGC CAACTGCAGA CGGCAGGCTT AAGCCTGAGG TTGTTGCTCC AGGAAACTGG 660
ATAATTGCTG CCAGAGCAAG TGGAAGTAGC ATGGGTCAAC CAATTAATGA CTATTACACA 720
GCAGCTCCTG GGACATCAAT GGCAACTCCT CACGTAGCTG GTATTGCAGC CCTCTTGCTC 780
CAAGCACACC CGAGCTGGAC TCCAGACAAA GTAAAAACAG CCCTCATAGA AACTGCTGAT 840
ATCGTAAAGC CAGATGAAAT AGCCGATATA GCCTACGGTG CAGGTAGGGT TAATGCATAC 900
AAGGCTATAA ACTACGATAA CTATGCAAAG CTAGTGTTC A CTGGATATGT TGCCAACAAA 960
GGCAGCCAAA CTCACCAGTT CGTTATTAGC GGAGCTTCGT TCGTAACTGC CACATTATAC 1020
TGGGACAATG CCAATAGCGA CCTTGATCTT TACCTCTACG ATCCCAATGG AAACCAGGTT 1080
GACTACTCTT ACACCGCCTA CTATGGATTC GAAAAGGTTG GTTATTACAA CCCAACTGAT 1140
GGAACATGGA CAATTAAGGT TGTAAGCTAC AGCGGAAGTG CAAACTATCA AGTAGATGTG 1200
GTAAGTGATG GTTCCCTTTC ACAGCCTGGA AGTTCA 1236
    
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

- (A) LÄNGE: 29
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:3:

```

Met Arg Ser Lys Lys Leu Trp Ile Ser Leu Leu Phe Ala Leu Thr
                    5                10                15
Leu Ile Phe Thr Met Ala Phe Ser Asn Met Ser Ala Gln Ala
                    20                25
    
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

- (A) LÄNGE: 522
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(ix) MERKMALE:

- (D) SONSTIGE ANGABEN: Xaa an Position 428 ist Gly oder Val

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:4:

```

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

	65		70		75
Ala Gly Thr Gly	Ala Ala Ser Asn Gly Lys Tyr Lys Gly Met Ala				
	80		85		90
Pro Gly Ala Lys	Leu Ala Gly Ile Lys Val Leu Gly Ala Asp Gly				
	95		100		105
Ser Gly Ser Ile	Ser Thr Ile Ile Lys Gly Val Glu Trp Ala Val				
	110		115		120
Asp Asn Lys Asp	Lys Tyr Gly Ile Lys Val Ile Asn Leu Ser Leu				
	125		130		135
Gly Ser Ser Gln	Ser Ser Asp Gly Thr Asp Ala Leu Ser Gln Ala				
	140		145		150
Val Asn Ala Ala	Trp Asp Ala Gly Leu Val Val Val Val Ala Ala				
	155		160		165
Gly Asn Ser Gly	Pro Asn Lys Tyr Thr Ile Gly Ser Pro Ala Ala				
	170		175		180
Ala Ser Lys Val	Ile Thr Val Gly Ala Val Asp Lys Tyr Asp Val				
	185		190		195
Ile Thr Ser Phe	Ser Ser Arg Gly Pro Thr Ala Asp Gly Arg Leu				
	200		205		210
Lys Pro Glu Val	Val Ala Pro Gly Asn Trp Ile Ile Ala Ala Arg				
	215		220		225
Ala Ser Gly Thr	Ser Met Gly Gln Pro Ile Asn Asp Tyr Tyr Thr				
	230		235		240
Ala Ala Pro Gly	Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ile				
	245		250		255
Ala Ala Leu Leu	Leu Gln Ala His Pro Ser Trp Thr Pro Asp Lys				
	260		265		270
Val Lys Thr Ala	Leu Ile Glu Thr Ala Asp Ile Val Lys Pro Asp				
	275		280		285
Glu Ile Ala Asp	Ile Ala Tyr Gly Ala Gly Arg Val Asn Ala Tyr				
	290		295		300
Lys Ala Ile Asn	Tyr Asp Asn Tyr Ala Lys Leu Val Phe Thr Gly				
	305		310		315
Tyr Val Ala Asn	Lys Gly Ser Gln Thr His Gln Phe Val Ile Ser				
	320		325		330
Gly Ala Ser Phe	Val Thr Ala Thr Leu Tyr Trp Asp Asn Ala Asn				
	335		340		345
Ser Asp Leu Asp	Leu Tyr Leu Tyr Asp Pro Asn Gly Asn Gln Val				
	350		355		360
Asp Tyr Ser Tyr	Thr Ala Tyr Tyr Gly Phe Glu Lys Val Gly Tyr				
	365		370		375
Tyr Asn Pro Thr	Asp Gly Thr Trp Thr Ile Lys Val Val Ser Tyr				
	380		385		390
Ser Gly Ser Ala	Asn Tyr Gln Val Asp Val Val Ser Asp Gly Ser				
	395		400		405
Leu Ser Gln Pro	Gly Ser Ser Pro Ser Pro Gln Pro Glu Pro Thr				
	410		415		420
Val Asp Ala Lys	Thr Phe Gln Xaa Ser Asp His Tyr Tyr Tyr Asp				
	425		430		435
Arg Ser Asp Thr	Phe Thr Met Thr Val Asn Ser Gly Ala Thr Lys				
	440		445		450
Ile Thr Gly Asp	Leu Val Phe Asp Thr Ser Tyr His Asp Leu Asp				
	455		460		465
Leu Tyr Leu Tyr	Asp Pro Asn Gln Lys Leu Val Asp Arg Ser Glu				
	470		475		480
Ser Pro Asn Ser	Tyr Glu His Val Glu Tyr Leu Thr Pro Ala Pro				
	485		490		495
Gly Thr Trp Tyr	Phe Leu Val Tyr Ala Tyr Tyr Thr Tyr Gly Trp				
	500		505		510
Ala Tyr Tyr Glu	Leu Thr Ala Lys Val Tyr Tyr Gly				
	515		520		

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:5:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN

- (A) LÄNGE: 4765
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISM: *Pyrococcus furiosus*
- (B) STAMM: DSM3638

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:5:

TTTAAATTAT	AAGATATAAT	CACTCCGAGT	GATGAGTAAG	ATACATCATT	ACAGTCCCAA	60
AATGTTTATA	ATTGGAACGC	AGTGAATATA	CAAAATGAAT	ATAACCTCGG	AGGTGACTGT	120
AGAATGAATA	AGAAGGGACT	TACTGTGCTA	TTTATAGCGA	TAATGCTCCT	TTCAGTAGTT	180
CCAGTGCCT	TTGTGTCCGC	AGAAACACCA	CCGGTTAGTT	CAGAAAATTC	AACAACCTCT	240
ATACTCCCTA	ACCAACAAGT	TGTGACAAAA	GAAGTTTCAC	AAGCGGCGCT	TAATGCTATA	300
ATGAAAGGAC	AACCCAACAT	GGTTCCTTATA	ATCAAGACTA	AGGAAGGCAA	ACTTGAAGAG	360
GCAAAAACCG	AGCTTGAAAA	GCTAGGTGCA	GAGATTCTTG	ACGAAAATAG	AGTTCTTAAC	420
ATGTTGCTAG	TTAAGATTAA	GCCTGAGAAA	GTTAAAGAGC	TCAACTATAT	CTCATCTCTT	480
GAAAAAGCCT	GGCTTAACAG	AGAAGTTAAG	CTTTCCCCTC	CAATTGTGCGA	AAAGGACGTC	540
AAGACTAAGG	AGCCCTCCCT	AGAACCAAAA	ATGTATAACA	GCACCTGGGT	AATTAATGCT	600
CTCCAGTTCA	TCCAGGAATT	TGGATATGAT	GGTAGTGGTG	TTGTTGTTGC	AGTACTTGAC	660
ACGGGAGTTG	ATCCGAACCA	TCCTTTCTTG	AGCATAACTC	CAGATGGACG	CAGGAAAATT	720
ATAGAATGGA	AGGATTTTAC	AGACGAGGGA	TTCGTGGATA	CATCATTGAG	CTTTAGCAAG	780
GTTGTAAATG	GGACTCTTAT	AATTAACACA	ACATTCCAAG	TGGCCTCAGG	TCTCACGCTG	840
AATGAATCGA	CAGGACTTAT	GGAATACGTT	GTTAAGACTG	TTTACGTGAG	CAATGTGACC	900
ATTGGAAATA	TCACTTCTGC	TAATGGCATC	TATCACTTCG	GCCTGCTCCC	AGAAAGATAC	960
TTCGACTTAA	ACTTCGATGG	TGATCAAGAG	GACTTCTATC	CTGTCTTATT	AGTTAACTCC	1020
ACTGGCAATG	GTTATGACAT	TGCATATGTG	GATACTGACC	TTGACTACGA	CTTCACCGAC	1080
GAAGTTCAC	TTGGCCAGTA	CAACGTTACT	TATGATGTTG	CTGTTTTTAG	CTACTACTAC	1140
GGTCCCTCA	ACTACGTGCT	TGCAGAAATA	GATCCTAACG	GAGAATATGC	AGTATTTGGG	1200
TGGGATGGTC	ACGGTACGGG	AACTCACGTA	GCTGGAATG	TTGCTGGTTA	CGACAGCAAC	1260
AATGATGCTT	GGGATTGGCT	CAGTATGTAC	TCTGGTGAAT	GGGAAGTGTT	CTCAAGACTC	1320
TATGGTTGGG	ATTATACGAA	CGTTACCACA	GACACCGTGC	AGGGTGTTGC	TCCAGGTGCC	1380
CAAATAATGG	CAATAAGAGT	TCTTAGGAGT	GATGGACGGG	GTAGCATGTG	GGATATTATA	1440
GAAGGTATGA	CATACGCAGC	AACCCATGGT	GCAGACGTTA	TAAGCATGAG	TCTCGGTGGA	1500
AATGCTCCAT	ACTTAGATGG	TACTGATCCA	GAAAGCGTTG	CTGTGGATGA	GCTTACCGAA	1560
AAGTACGGTG	TTGTATTCGT	AATAGCTGCA	GGAAATGAAG	GTCCTGGCAT	TAACATCGTT	1620
GGAAGTCCCTG	GTGTTGCAAC	AAAGGCAATA	ACTGTTGGAG	CTGCTGCAGT	GCCCATTAAAC	1680
GTTGGAGTTT	ATGTTTCCCA	AGCACTTGGA	TATCCTGATT	ACTATGGATT	CTATTACTTC	1740
CCCGCTACA	CAAACGTTAG	AATAGCATTG	TTCTCAAGCA	GAGGGCCGAG	AATAGATGGT	1800
GAAATAAAAC	CCAATGTAGT	GGCTCCAGGT	TACGGAATTT	ACTCATCCCT	GCCGATGTGG	1860
ATTGGCGGAG	CTGACTTCAT	GTCTGGAACT	TCGATGGCTA	CTCCACATGT	CAGCGGTGTC	1920
GTTGCACTCC	TCATAAGCGG	GGCAAAGGCC	GAGGGAATAT	ACTACAATCC	AGATATAATT	1980
AAGAAGGTTT	TTGAGAGCGG	TGCAACCTGG	CTTGAGGGAG	ATCCATATAC	TGGGCAGAAG	2040
TACACTGAGC	TTGACCAAGG	TCATGGTCTT	GTTAACGTTA	CCAAGTCCCTG	GGAAATCCTT	2100
AAGGCTATAA	ACGGCACCCAC	TCTCCCAATT	GTTGATCACT	GGGCAGACAA	GTCTACAGC	2160
GACTTTGCGG	AGTACTTGGG	TGTGGACGTT	ATAAGAGGTC	TCTACGCAAG	GAACCTCTATA	2220
CCTGACATTG	TCGAGTGGCA	CATTAAGTAC	GTAGGGGACA	CGGAGTACAG	AACTTTTGAG	2280
ATCTATGCAA	CTGAGCCATG	GATTAAGCCT	TTTGTCAGTG	GAAGTGTAA	TCTAGAGAAC	2340
AATACCGAGT	TTGTCCTTAG	GGTCAAATAT	GATGTAGAGG	GTCTTGAGCC	AGGTACTCTAT	2400
GTTGGAAGGA	TAATCATTGA	TGATCCAACA	ACGCCAGTTA	TTGAAGACGA	GATCTTGAAC	2460
ACAATTGTTA	TTCCCGAGAA	GTTCACTCCT	GAGAACAATT	ACACCCCTCAC	CTGGTATGAT	2520
ATTAATGGTC	CAGAAATGGT	GACTCACCAC	TTCTTCACTG	TGCCTGAGGG	AGTGGACGTT	2580
CTCTACGCGA	TGACCACATA	CTGGGACTAC	GGTCTGTACA	GACCAGATGG	AATGTTTGTG	2640
TTCCCATACC	AGCTAGATTA	TCTTCCCGCT	GCAGTCTCAA	ATCCAATGCC	TGGAACTGG	2700
GAGCTAGTAT	GGACTGGATT	TAACTTTGCA	CCCCTCTATG	AGTCGGGCTT	CCTTGTAAGG	2760
ATTTACGGAG	TAGAGATAAC	TCCAAGCGTT	TGGTACATTA	ACAGGACATA	CCTTGACACT	2820

```

AACACTGAAT TCTCAATTGA ATTCAATATT ACTAACATCT ATGCCCCAAT TAATGCAACT 2880
CTAATCCCCA TTGGCCTTGG AACCTACAAT GCGAGCGTTG AAAGCGTTGG TGATGGAGAG 2940
TTCTTCATAA AGGGCATTGA AGTTCTCTGAA GGCACCGCAG AGTTGAAGAT TAGGATAGGC 3000
AACCCAAAGT TTCCGAATTC AGATCTAGAC TTGTACCTTT ATGACAGTAA AGGCAATTTA 3060
GTGGCCCTTAG ATGGAAACCC AACAGCAGAA GAAGAGGTTG TAGTTGAGTA TCCTAAGCCT 3120
GGAGTTTATT CAATAGTAGT ACATGGTTAC AGCGTCAGGG ACGAAAATGG TAATCCAACG 3180
ACAACCACCT TTGACTTAGT TGTTCAAATG ACCCTTGATA ATGGAAACAT AAAGCTTGAC 3240
AAAGACTCGA TTATTCTTGG AAGCAATGAA AGCGTAGTTG TAACTGCAAAA CATAACAATT 3300
GATAGAGATC ATCCTACAGG AGTATACTCT GGTATCATAG AGATTAGAGA TAATGAGGTC 3360
TACCAGGATA CAAATACTTC AATTGCGAAA ATACCCATAA CTTTGGTAAT TGACAAGGCG 3420
GACTTTGCCG TTGGTCTCAC ACCAGCAGAG GGAGTACTTG GAGAGGCTAG AAATTACACT 3480
CTAATTGTAA AGCATGCCCT AACACTAGAG CCTGTGCCAA ATGCTACAGT GATTATAGGA 3540
AACTACACCT ACCTCACAGA CGAAAACGGT ACAGTGACAT TCACGTATGC TCCAAC TAAG 3600
TTAGGCAGTG ATGAAATCAC AGTCATAGTT AAGAAAGAGA ACTTCAACAC ATTAGAGAAG 3660
ACCTTCCAAA TCACAGTATC AGAGCCTGAA ATAACTGAAG AGGACATAAA TGAGCCCAAG 3720
CTTGCAATGT CATCACCAGA AGCAAATGCT ACCATAGTAT CAGTTGAGAT GGAGAGTGAG 3780
GGTGGCGTTA AAAAGACAGT GACAGTGGAA ATAACTATAA ACGGAACCGC TAATGAGACT 3840
GCAACAATAG TGGTTCCTGT TCCTAAGAAG GCCGAAAACA TCGAGGTAAG TGGAGACCAC 3900
GTAATTTCCCT ATAGTATAGA GGAAGGAGAG TACGCCAAGT ACGTTATAAT TACAGTGAAG 3960
TTTGCATCAC CTGTAACAGT AACTGTTACT TACACTATCT ATGCTGGCCC AAGAGTCTCA 4020
ATCTTGACAC TTAACCTTCT TGGCTACTCA TGGTACAGAC TATATTCACA GAAGTTTGAC 4080
GAATTGTACC AAAAGGCCCT TGAATTGGGA GTGGACAACG AGACATTAGC TTTAGCCCTC 4140
AGCTACCATG AAAAAGCCAA AGAGTACTAC GAAAAGGCCC TTGAGCTTAG CGAGGGTAAC 4200
ATAATCCAAT ACCTTGGAGA CATAAGACTA TTACCTCCAT TAAGACAGGC ATACATCAAT 4260
GAAATGAAGG CAGTTAAGAT ACTGGAAAAG GCCATAGAAG AATTAGAGGG TGAAGAGTAA 4320
TCTCCAATTT TTCCCACTTT TTCTTTTATA ACATTCCAAG CCTTTTCTTA GCTTCTTCGC 4380
TCATTCTATC AGGAGTCCAT GGAGGATCAA AGGTAAGTTC AACCTCCACA TCTCTTACTC 4440
CTGGGATTTG GAGTACTTTC TCCTCTACAG CTCTAAGAAG CCAGAGAGTT AAAGGACACC 4500
CAGGAGTTGT CATTGTCATC TTTATATATA CCGTTTTGTC AGGATTAATC TTTAGCTCAT 4560
AAATTAATCC AAGGTTTACA ACATCCATCC CAATTTCTGG GTCGATAACC TCCTTTAGCT 4620
TTTCCAGAAT CATTCTTCA GTAATTTCAA GGTTCTCATC TTTGGTTTCT CTCACAAACC 4680
CAATTTCAAC CTGCCTGATA CCTTCTAACT CCCTAAGCTT GTTATATATC TCCAAAAGAG 4740
TGGCATCATC AATTTTCTCT TTAAA 4765

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

- (A) LÄNGE: 1398
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:6:

```

Met Asn Lys Lys Gly Leu Thr Val Leu Phe Ile Ala Ile Met Leu
                    5                      10                      15
Leu Ser Val Val Pro Val His Phe Val Ser Ala Glu Thr Pro Pro
                    20                      25                      30
Val Ser Ser Glu Asn Ser Thr Thr Ser Ile Leu Pro Asn Gln Gln
                    35                      40                      45
Val Val Thr Lys Glu Val Ser Gln Ala Ala Leu Asn Ala Ile Met
                    50                      55                      60
Lys Gly Gln Pro Asn Met Val Leu Ile Ile Lys Thr Lys Glu Gly
                    65                      70                      75
Lys Leu Glu Glu Ala Lys Thr Glu Leu Glu Lys Leu Gly Ala Glu
                    80                      85                      90
Ile Leu Asp Glu Asn Arg Val Leu Asn Met Leu Leu Val Lys Ile
                    95                      100                     105
Lys Pro Glu Lys Val Lys Glu Leu Asn Tyr Ile Ser Ser Leu Glu
                    110                     115                     120

```

Lys	Ala	Trp	Leu	Asn	Arg	Glu	Val	Lys	Leu	Ser	Pro	Pro	Ile	Val
				125					130					135
Glu	Lys	Asp	Val	Lys	Thr	Lys	Glu	Pro	Ser	Leu	Glu	Pro	Lys	Met
				140					145					150
Tyr	Asn	Ser	Thr	Trp	Val	Ile	Asn	Ala	Leu	Gln	Phe	Ile	Gln	Glu
				155					160					165
Phe	Gly	Tyr	Asp	Gly	Ser	Gly	Val	Val	Val	Ala	Val	Leu	Asp	Thr
				170					175					180
Gly	Val	Asp	Pro	Asn	His	Pro	Phe	Leu	Ser	Ile	Thr	Pro	Asp	Gly
				185					190					195
Arg	Arg	Lys	Ile	Ile	Glu	Trp	Lys	Asp	Phe	Thr	Asp	Glu	Gly	Phe
				200					205					210
Val	Asp	Thr	Ser	Phe	Ser	Phe	Ser	Lys	Val	Val	Asn	Gly	Thr	Leu
				215					220					225
Ile	Ile	Asn	Thr	Thr	Phe	Gln	Val	Ala	Ser	Gly	Leu	Thr	Leu	Asn
				230					235					240
Glu	Ser	Thr	Gly	Leu	Met	Glu	Tyr	Val	Val	Lys	Thr	Val	Tyr	Val
				245					250					255
Ser	Asn	Val	Thr	Ile	Gly	Asn	Ile	Thr	Ser	Ala	Asn	Gly	Ile	Tyr
				260					265					270
His	Phe	Gly	Leu	Leu	Pro	Glu	Arg	Tyr	Phe	Asp	Leu	Asn	Phe	Asp
				275					280					285
Gly	Asp	Gln	Glu	Asp	Phe	Tyr	Pro	Val	Leu	Leu	Val	Asn	Ser	Thr
				290					295					300
Gly	Asn	Gly	Tyr	Asp	Ile	Ala	Tyr	Val	Asp	Thr	Asp	Leu	Asp	Tyr
				305					310					315
Asp	Phe	Thr	Asp	Glu	Val	Pro	Leu	Gly	Gln	Tyr	Asn	Val	Thr	Tyr
				320					325					330
Asp	Val	Ala	Val	Phe	Ser	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Pro	Leu	Asn	Tyr	Val
				335					340					345
Leu	Ala	Glu	Ile	Asp	Pro	Asn	Gly	Glu	Tyr	Ala	Val	Phe	Gly	Trp
				350					355					360
Asp	Gly	His	Gly	His	Gly	Thr	His	Val	Ala	Gly	Thr	Val	Ala	Gly
				365					370					375
Tyr	Asp	Ser	Asn	Asn	Asp	Ala	Trp	Asp	Trp	Leu	Ser	Met	Tyr	Ser
				380					385					390
Gly	Glu	Trp	Glu	Val	Phe	Ser	Arg	Leu	Tyr	Gly	Trp	Asp	Tyr	Thr
				395					400					405
Asn	Val	Thr	Thr	Asp	Thr	Val	Gln	Gly	Val	Ala	Pro	Gly	Ala	Gln
				410					415					420
Ile	Met	Ala	Ile	Arg	Val	Leu	Arg	Ser	Asp	Gly	Arg	Gly	Ser	Met
				425					430					435
Trp	Asp	Ile	Ile	Glu	Gly	Met	Thr	Tyr	Ala	Ala	Thr	His	Gly	Ala
				440					445					450
Asp	Val	Ile	Ser	Met	Ser	Leu	Gly	Gly	Asn	Ala	Pro	Tyr	Leu	Asp
				455					460					465
Gly	Thr	Asp	Pro	Glu	Ser	Val	Ala	Val	Asp	Glu	Leu	Thr	Glu	Lys
				470					475					480
Tyr	Gly	Val	Val	Phe	Val	Ile	Ala	Ala	Gly	Asn	Glu	Gly	Pro	Gly
				485					490					495
Ile	Asn	Ile	Val	Gly	Ser	Pro	Gly	Val	Ala	Thr	Lys	Ala	Ile	Thr
				500					505					510
Val	Gly	Ala	Ala	Ala	Val	Pro	Ile	Asn	Val	Gly	Val	Tyr	Val	Ser
				515					520					525
Gln	Ala	Leu	Gly	Tyr	Pro	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Tyr	Phe	Pro
				530					535					540
Ala	Tyr	Thr	Asn	Val	Arg	Ile	Ala	Phe	Phe	Ser	Ser	Arg	Gly	Pro
				545					550					555
Arg	Ile	Asp	Gly	Glu	Ile	Lys	Pro	Asn	Val	Val	Ala	Pro	Gly	Tyr
				560					565					570
Gly	Ile	Tyr	Ser	Ser	Leu	Pro	Met	Trp	Ile	Gly	Gly	Ala	Asp	Phe
				575					580					585
Met	Ser	Gly	Thr	Ser	Met	Ala	Thr	Pro	His	Val	Ser	Gly	Val	Val

	590		595		600
Ala Leu Leu Ile Ser Gly Ala Lys Ala Glu Gly Ile Tyr Tyr Asn					
	605		610		615
Pro Asp Ile Ile Lys Lys Val Leu Glu Ser Gly Ala Thr Trp Leu					
	620		625		630
Glu Gly Asp Pro Tyr Thr Gly Gln Lys Tyr Thr Glu Leu Asp Gln					
	635		640		645
Gly His Gly Leu Val Asn Val Thr Lys Ser Trp Glu Ile Leu Lys					
	650		655		660
Ala Ile Asn Gly Thr Thr Leu Pro Ile Val Asp His Trp Ala Asp					
	665		670		675
Lys Ser Tyr Ser Asp Phe Ala Glu Tyr Leu Gly Val Asp Val Ile					
	680		685		690
Arg Gly Leu Tyr Ala Arg Asn Ser Ile Pro Asp Ile Val Glu Trp					
	695		700		705
His Ile Lys Tyr Val Gly Asp Thr Glu Tyr Arg Thr Phe Glu Ile					
	710		715		720
Tyr Ala Thr Glu Pro Trp Ile Lys Pro Phe Val Ser Gly Ser Val					
	725		730		735
Ile Leu Glu Asn Asn Thr Glu Phe Val Leu Arg Val Lys Tyr Asp					
	740		745		750
Val Glu Gly Leu Glu Pro Gly Leu Tyr Val Gly Arg Ile Ile Ile					
	755		760		765
Asp Asp Pro Thr Thr Pro Val Ile Glu Asp Glu Ile Leu Asn Thr					
	770		775		780
Ile Val Ile Pro Glu Lys Phe Thr Pro Glu Asn Asn Tyr Thr Leu					
	785		790		795
Thr Trp Tyr Asp Ile Asn Gly Pro Glu Met Val Thr His His Phe					
	800		805		810
Phe Thr Val Pro Glu Gly Val Asp Val Leu Tyr Ala Met Thr Thr					
	815		820		825
Tyr Trp Asp Tyr Gly Leu Tyr Arg Pro Asp Gly Met Phe Val Phe					
	830		835		840
Pro Tyr Gln Leu Asp Tyr Leu Pro Ala Ala Val Ser Asn Pro Met					
	845		850		855
Pro Gly Asn Trp Glu Leu Val Trp Thr Gly Phe Asn Phe Ala Pro					
	860		865		870
Leu Tyr Glu Ser Gly Phe Leu Val Arg Ile Tyr Gly Val Glu Ile					
	875		880		885
Thr Pro Ser Val Trp Tyr Ile Asn Arg Thr Tyr Leu Asp Thr Asn					
	890		895		900
Thr Glu Phe Ser Ile Glu Phe Asn Ile Thr Asn Ile Tyr Ala Pro					
	905		910		915
Ile Asn Ala Thr Leu Ile Pro Ile Gly Leu Gly Thr Tyr Asn Ala					
	920		925		930
Ser Val Glu Ser Val Gly Asp Gly Glu Phe Phe Ile Lys Gly Ile					
	935		940		945
Glu Val Pro Glu Gly Thr Ala Glu Leu Lys Ile Arg Ile Gly Asn					
	950		955		960
Pro Ser Val Pro Asn Ser Asp Leu Asp Leu Tyr Leu Tyr Asp Ser					
	965		970		975
Lys Gly Asn Leu Val Ala Leu Asp Gly Asn Pro Thr Ala Glu Glu					
	980		985		990
Glu Val Val Val Glu Tyr Pro Lys Pro Gly Val Tyr Ser Ile Val					
	995		1000		1005
Val His Gly Tyr Ser Val Arg Asp Glu Asn Gly Asn Pro Thr Thr					
	1010		1015		1020
Thr Thr Phe Asp Leu Val Val Gln Met Thr Leu Asp Asn Gly Asn					
	1025		1030		1035
Ile Lys Leu Asp Lys Asp Ser Ile Ile Leu Gly Ser Asn Glu Ser					
	1040		1045		1050
Val Val Val Thr Ala Asn Ile Thr Ile Asp Arg Asp His Pro Thr					
	1055		1060		1065

Gly Val Tyr Ser Gly Ile Ile Glu Ile Arg Asp Asn Glu Val Tyr  
 1070 1075 1080  
 Gln Asp Thr Asn Thr Ser Ile Ala Lys Ile Pro Ile Thr Leu Val  
 1085 1090 1095  
 Ile Asp Lys Ala Asp Phe Ala Val Gly Leu Thr Pro Ala Glu Gly  
 1100 1105 1110  
 Val Leu Gly Glu Ala Arg Asn Tyr Thr Leu Ile Val Lys His Ala  
 1115 1120 1125  
 Leu Thr Leu Glu Pro Val Pro Asn Ala Thr Val Ile Ile Gly Asn  
 1130 1135 1140  
 Tyr Thr Tyr Leu Thr Asp Glu Asn Gly Thr Val Thr Phe Thr Tyr  
 1145 1150 1155  
 Ala Pro Thr Lys Leu Gly Ser Asp Glu Ile Thr Val Ile Val Lys  
 1160 1165 1170  
 Lys Glu Asn Phe Asn Thr Leu Glu Lys Thr Phe Gln Ile Thr Val  
 1175 1180 1185  
 Ser Glu Pro Glu Ile Thr Glu Glu Asp Ile Asn Glu Pro Lys Leu  
 1190 1195 1200  
 Ala Met Ser Ser Pro Glu Ala Asn Ala Thr Ile Val Ser Val Glu  
 1205 1210 1215  
 Met Glu Ser Glu Gly Gly Val Lys Lys Thr Val Thr Val Glu Ile  
 1220 1225 1230  
 Thr Ile Asn Gly Thr Ala Asn Glu Thr Ala Thr Ile Val Val Pro  
 1235 1240 1245  
 Val Pro Lys Lys Ala Glu Asn Ile Glu Val Ser Gly Asp His Val  
 1250 1255 1260  
 Ile Ser Tyr Ser Ile Glu Glu Gly Glu Tyr Ala Lys Tyr Val Ile  
 1265 1270 1275  
 Ile Thr Val Lys Phe Ala Ser Pro Val Thr Val Thr Val Thr Tyr  
 1280 1285 1290  
 Thr Ile Tyr Ala Gly Pro Arg Val Ser Ile Leu Thr Leu Asn Phe  
 1295 1300 1305  
 Leu Gly Tyr Ser Trp Tyr Arg Leu Tyr Ser Gln Lys Phe Asp Glu  
 1310 1315 1320  
 Leu Tyr Gln Lys Ala Leu Glu Leu Gly Val Asp Asn Glu Thr Leu  
 1325 1330 1335  
 Ala Leu Ala Leu Ser Tyr His Glu Lys Ala Lys Glu Tyr Tyr Glu  
 1340 1345 1350  
 Lys Ala Leu Glu Leu Ser Glu Gly Asn Ile Ile Gln Tyr Leu Gly  
 1355 1360 1365  
 Asp Ile Arg Leu Leu Pro Pro Leu Arg Gln Ala Tyr Ile Asn Glu  
 1370 1375 1380  
 Met Lys Ala Val Lys Ile Leu Glu Lys Ala Ile Glu Glu Leu Glu  
 1385 1390 1395  
 Gly Glu Glu

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

- (A) LÄNGE: 35
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure (synthetische DNA)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:7:

GGWWSDRRTG TTRRHGTHGC DGTDMTYGAC ACBGG

35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:8:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN
  - (A) LÄNGE: 32
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure (synthetische DNA)
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:8:

KSTCACGGAA CTCACGTDGC BGGHACDGTT GC 32

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:9:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN
  - (A) LÄNGE: 33
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nukleinsäure (synthetische DNA)
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:9:

ASCMGCAACH GTKCCVGCHA CGTGAGTTCC GTG 33

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:10:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN
  - (A) LÄNGE: 34
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nukleinsäure (synthetische DNA)
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:10:

CHCCGSYVAC RTGBGGAGWD GCCATBGAVG TDCC 34

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:11:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN
  - (A) LÄNGE: 1977
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Doppelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
  - (A) ORGANISM: Thermococcus celer
  - (B) STAMM: DSM2476
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:11:

ATGAAGAGGT TAGGTGCTGT GGTGCTGGCA CTGGTGCTCG TGGGTCTTCT GGCCGGAACG 60  
 GCCCTTGCGG CACCCGTAAA ACCGGTTGTC AGGAACAACG CGGTTTCAGCA GAAGAATAC 120  
 GGAAGTCTGA CCCCAGGACT GTTCAAGAAA GTCCAGAGGA TGAAGTGGAA CCAGGAAGTG 180

```

GACACCGTCA TAATGTTCCGG GAGCTACGGA GACAGGGACA GGGCGGTAA GGTACTGAGG 240
CTCATGGGCG CCCAGGTCAA GTACTCCTAC AAGATAATCC CTGCTGTCGC GGTAAAAATA 300
AAGGCCAGGG ACCTTCTGCT GATCGCGGGC ATGATAGACA CGGGTACTT CGGTAACACA 360
AGGGTCTCGG GCATAAAGTT CATAACAGGAG GATTACAAGG TTCAGGTTGA CGACGCCACT 420
TCCGTCTCCC AGATAGGGGC CGATACCGTC TGGAACTCCC TCGGCTACGA CGGAAGCGGT 480
GTGGTGGTTG CATACGTGCGA TACGGGTATA GACGCGAACC ACCCCGATCT GAAGGGCAAG 540
GTCATAGGCT GGTACGACGC CGTCAACGGC AGGTCGACCC CCTACGATGA CCAGGGACAC 600
GGAACCCACG TTGCGGGTAT CGTTGCCGGA ACCGGCAGCG TTAACTCCCA GTACATAGGC 660
GTCGCCCCCG GCGCGAAGCT CGTCGGCGTC AAGGTTCTCG GTGCCGACGG TTCGGGAAGC 720
GTCTCCACCA TCATCGCGGG TGTTGACTGG GTCGTCCAGA ACAAGGACAA GTACGGGATA 780
AGGGTCATCA ACCTCTCCCT CGGCTCCTCC CAGAGCTCCG ACGGAACCGA CTCCCTCAGT 840
CAGGCCGTCA ACAACGCCTG GGACGCCGGT ATAGTAGTCT GCGTCGCCGC CGGCAACAGC 900
GGGCCGAACA CCTACACCGT CGGCTCACCC GCCGCCGCGA GCAAGGTCAT AACCGTCGGT 960
GCAGTTGACA GCAACGACAA CATCGCCAGC TTCTCCAGCA GGGGACCGAC CGCGGACGGA 1020
AGGCTCAAGC CGGAAGTCGT CGCCCCCGGC GTTGACATCA TAGCCCCGCG CGCCAGCGGA 1080
ACCAGCATGG GCACCCCGAT AAACGACTAC TACACCAAGG CCTCTGGAAC CAGCATGGCC 1140
ACCCCGCACG TTTCGGGCGT TGGCGCGCTC ATCCTCCAGG CCCACCCGAG CTGGACCCCG 1200
GACAAGGTGA AGACCGCCCT CATCGAGACC GCCGACATAG TCGCCCCCAA GGAGATAGCG 1260
GACATCGCCT ACGGTGCGGG TAGGGTGAAC GTCTACAAGG CCATCAAGTA CGACGACTAC 1320
GCCAAGCTCA CCTTACCCGG CTCCGTCGCC GACAAGGGAA GCGCCACCCA CACCTTCGAC 1380
GTCAGCGCGC CCACCTTCGT GACCGCCACC CTCTACTGGG ACACGGGCTC GAGCGACATC 1440
GACCTCTACC TCTACGACCC CAACGGGAAC GAGGTTGACT ACTCCTACAC CGCCTACTAC 1500
GGCTTCGAGA AGGTCGGCTA CTACAACCCG ACCGCGGAA CCTGGACGGT CAAGGTCGTC 1560
AGCTACAAGG GCGCGGCGAA CTACCAGGTC GACGTCGTCA GCGACGGGAG CCTCAGCCAG 1620
TCCGGCGGCG GCAACCCGAA TCCAAACCCC AACCCGAACC CAACCCCGAC CACCGACACC 1680
CAGACCTTCA CCGGTTCCGT TAACGACTAC TGGGACACCA GCGACACCTT CACCATGAAC 1740
GTCAACAGCG GTGCCACCAA GATAACCGGT GACCTGACCT TCGATACTTC CTACAACGAC 1800
CTCGACCTCT ACCTCTACGA CCCCAACGGC AACCTCGTTG ACAGGTCCAC GTCGAGCAAC 1860
AGCTACGAGC ACGTCGAGTA CGCCAACCCC GCCCGGGGAA CCTGGACGTT CCTCGTCTAC 1920
GCCTACAGCA CCTACGGCTG GGCGGACTAC CAGCTCAAGG CCGTCGTCTA CTACGGG 1977

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

- (A) LÄNGE: 659
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:12:

```

Met Lys Arg Leu Gly Ala Val Val Leu Ala Leu Val Leu Val Gly
                    5                10                15
Leu Leu Ala Gly Thr Ala Leu Ala Ala Pro Val Lys Pro Val Val
                    20                25                30
Arg Asn Asn Ala Val Gln Gln Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Thr Pro
                    35                40                45
Gly Leu Phe Lys Lys Val Gln Arg Met Asn Trp Asn Gln Glu Val
                    50                55                60
Asp Thr Val Ile Met Phe Gly Ser Tyr Gly Asp Arg Asp Arg Ala
                    65                70                75
Val Lys Val Leu Arg Leu Met Gly Ala Gln Val Lys Tyr Ser Tyr
                    80                85                90
Lys Ile Ile Pro Ala Val Ala Val Lys Ile Lys Ala Arg Asp Leu
                    95                100               105
Leu Leu Ile Ala Gly Met Ile Asp Thr Gly Tyr Phe Gly Asn Thr
                    110               115               120
Arg Val Ser Gly Ile Lys Phe Ile Gln Glu Asp Tyr Lys Val Gln
                    125               130               135
Val Asp Asp Ala Thr Ser Val Ser Gln Ile Gly Ala Asp Thr Val

```

				140					145					150
Trp	Asn	Ser	Leu	Gly	Tyr	Asp	Gly	Ser	Gly	Val	Val	Val	Ala	Ile
				155					160					165
Val	Asp	Thr	Gly	Ile	Asp	Ala	Asn	His	Pro	Asp	Leu	Lys	Gly	Lys
				170					175					180
Val	Ile	Gly	Trp	Tyr	Asp	Ala	Val	Asn	Gly	Arg	Ser	Thr	Pro	Tyr
				185					190					195
Asp	Asp	Gln	Gly	His	Gly	Thr	His	Val	Ala	Gly	Ile	Val	Ala	Gly
				200					205					210
Thr	Gly	Ser	Val	Asn	Ser	Gln	Tyr	Ile	Gly	Val	Ala	Pro	Gly	Ala
				215					220					225
Lys	Leu	Val	Gly	Val	Lys	Val	Leu	Gly	Ala	Asp	Gly	Ser	Gly	Ser
				230					235					240
Val	Ser	Thr	Ile	Ile	Ala	Gly	Val	Asp	Trp	Val	Val	Gln	Asn	Lys
				245					250					255
Asp	Lys	Tyr	Gly	Ile	Arg	Val	Ile	Asn	Leu	Ser	Leu	Gly	Ser	Ser
				260					265					270
Gln	Ser	Ser	Asp	Gly	Thr	Asp	Ser	Leu	Ser	Gln	Ala	Val	Asn	Asn
				275					280					285
Ala	Trp	Asp	Ala	Gly	Ile	Val	Val	Cys	Val	Ala	Ala	Gly	Asn	Ser
				290					295					300
Gly	Pro	Asn	Thr	Tyr	Thr	Val	Gly	Ser	Pro	Ala	Ala	Ala	Ser	Lys
				305					310					315
Val	Ile	Thr	Val	Gly	Ala	Val	Asp	Ser	Asn	Asp	Asn	Ile	Ala	Ser
				320					325					330
Phe	Ser	Ser	Arg	Gly	Pro	Thr	Ala	Asp	Gly	Arg	Leu	Lys	Pro	Glu
				335					340					345
Val	Val	Ala	Pro	Gly	Val	Asp	Ile	Ile	Ala	Pro	Arg	Ala	Ser	Gly
				350					355					360
Thr	Ser	Met	Gly	Thr	Pro	Ile	Asn	Asp	Tyr	Tyr	Thr	Lys	Ala	Ser
				365					370					375
Gly	Thr	Ser	Met	Ala	Thr	Pro	His	Val	Ser	Gly	Val	Gly	Ala	Leu
				380					385					390
Ile	Leu	Gln	Ala	His	Pro	Ser	Trp	Thr	Pro	Asp	Lys	Val	Lys	Thr
				395					400					405
Ala	Leu	Ile	Glu	Thr	Ala	Asp	Ile	Val	Ala	Pro	Lys	Glu	Ile	Ala
				410					415					420
Asp	Ile	Ala	Tyr	Gly	Ala	Gly	Arg	Val	Asn	Val	Tyr	Lys	Ala	Ile
				425					430					435
Lys	Tyr	Asp	Asp	Tyr	Ala	Lys	Leu	Thr	Phe	Thr	Gly	Ser	Val	Ala
				440					445					450
Asp	Lys	Gly	Ser	Ala	Thr	His	Thr	Phe	Asp	Val	Ser	Gly	Ala	Thr
				455					460					465
Phe	Val	Thr	Ala	Thr	Leu	Tyr	Trp	Asp	Thr	Gly	Ser	Ser	Asp	Ile
				470					475					480
Asp	Leu	Tyr	Leu	Tyr	Asp	Pro	Asn	Gly	Asn	Glu	Val	Asp	Tyr	Ser
				485					490					495
Tyr	Thr	Ala	Tyr	Tyr	Gly	Phe	Glu	Lys	Val	Gly	Tyr	Tyr	Asn	Pro
				500					505					510
Thr	Ala	Gly	Thr	Trp	Thr	Val	Lys	Val	Val	Ser	Tyr	Lys	Gly	Ala
				515					520					525
Ala	Asn	Tyr	Gln	Val	Asp	Val	Val	Ser	Asp	Gly	Ser	Leu	Ser	Gln
				530					535					540
Ser	Gly	Gly	Gly	Asn	Pro	Asn	Pro	Asn	Pro	Asn	Pro	Asn	Pro	Thr
				545					550					555
Pro	Thr	Thr	Asp	Thr	Gln	Thr	Phe	Thr	Gly	Ser	Val	Asn	Asp	Tyr
				560					565					570
Trp	Asp	Thr	Ser	Asp	Thr	Phe	Thr	Met	Asn	Val	Asn	Ser	Gly	Ala
				575					580					585
Thr	Lys	Ile	Thr	Gly	Asp	Leu	Thr	Phe	Asp	Thr	Ser	Tyr	Asn	Asp
				590					595					600
Leu	Asp	Leu	Tyr	Leu	Tyr	Asp	Pro	Asn	Gly	Asn	Leu	Val	Asp	Arg
				605					610					615

Ser	Thr	Ser	Ser	Asn	Ser	Tyr	Glu	His	Val	Glu	Tyr	Ala	Asn	Pro
				620					625					630
Ala	Pro	Gly	Thr	Trp	Thr	Phe	Leu	Val	Tyr	Ala	Tyr	Ser	Thr	Tyr
				635					640					645
Gly	Trp	Ala	Asp	Tyr	Gln	Leu	Lys	Ala	Val	Val	Tyr	Tyr	Gly	
				650					655					

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

- (A) LÄNGE: 28
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nukleinsäure (synthetische DNA)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:13:

AGAGGGATCC ATGAAGGGGC TGAAAGCT

28

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

- (A) LÄNGE: 28
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nukleinsäure (synthetische DNA)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:14:

AGAGGCATGC GCTCTAGACT CTGGGAGAGT

28

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

- (A) LÄNGE: 1962
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISM: Pyrococcus furiosus
- (B) STAMM: DSM3638

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:15:

ATGAAGGGGC	TGAAAGCTCT	CATATTAGTG	ATTTTAGTTC	TAGGTTTGGT	AGTAGGGAGC	60
GTAGCGGCAG	CTCCAGAGAA	GAAAGTTGAA	CAAGTAAGAA	ATGTTGAGAA	GAACTATGGT	120
CTGCTAACGC	CAGGACTGTT	CAGAAAAATT	CAAAAATTGA	ATCCTAACGA	GGAAATCAGC	180
ACAGTAATTG	TATTTGAAAA	CCATAGGGAA	AAAGAAATTG	CAGTAAGAGT	TCTTGAGTTA	240
ATGGGTGCAA	AAGTTAGGTA	TGTGTACCAT	ATTATACCCG	CAATAGCTGC	CGATCTTAAG	300
GTTAGAGACT	TACTAGTCAT	CTCAGGTTTA	ACAGGGGGTA	AAGCTAAGCT	TTCAGGTGTT	360
AGGTTTATCC	AGGAAGACTA	CAAAGTTACA	GTTTCAGCAG	AATTAGAAGG	ACTGGATGAG	420
TCTGCAGCTC	AAGTTATGGC	AACTTACGTT	TGGAACTTGG	GATATGATGG	TTCTGGAATC	480
ACAATAGGAA	TAATTGACAC	TGGAATTGAC	GCTTCTCATC	CAGATCTCCA	AGGAAAAGTA	540

```

ATTGGGTGGG TAGATTTTGT CAATGGTAGG AGTTATCCAT ACGATGACCA TGGACATGGA 600
ACTCATGTAG CTTCAATAGC AGCTGGTACT GGAGCAGCAA GTAATGGCAA GTACAAGGGA 660
ATGGCTCCAG GAGCTAAGCT GCGGGGAATT AAGGTTCTAG GTGCCGATGG TTCTGGAAGC 720
ATATCTACTA TAATTAAGGG AGTTGAGTGG GCCGTTGATA ACAAAGATAA GTACGGAATT 780
AAGGTCAATTA ATCTTTCTCT TGGTTCAAGC CAGAGCTCAG ATGGTACTGA CGCTCTAAGT 840
CAGGCTGTTA ATGCAGCGTG GGATGCTGGA TTAGTTGTTG TGGTTGCCGC TGGAAACAGT 900
GGACCTAACA AGTATACAAT CGGTTCTCCA GCAGTGCAA GCAAAGTTAT TACAGTTGGA 960
GCCGTTGACA AGTATGATGT TATAACAAGC TTCTCAAGCA GAGGGCCAAC TGCAGACGGC 1020
AGGCTTAAGC CTGAGGTTGT TGCTCCAGGA AACTGGATAA TTGCTGCCAG AGCAAGTGGA 1080
ACTAGCATGG GTCAACCAAT TAATGACTAT TACACAGCAG CTCCTGGGAC ATCAATGGCA 1140
ACTCCTCAGC TAGCTGGTAT TGCAGCCCTC TTGCTCCAAG CACACCCGAG CTGGACTCCA 1200
GACAAAGTAA AAACAGCCCT CATAGAAACT GCTGATATCG TAAAGCCAGA TGAATAGCC 1260
GATATAGCCT ACGGTGCAGG TAGGGTTAAT GCATACAAGG CTATAAACTA CGATAACTAT 1320
GCAAAGCTAG TGTTCACTGG ATATGTTGCC AACAAAGGCA GCCAAACTCA CCAGTTCGTT 1380
ATTAGCGGAG CTTTCGTTCTG AACTGCCACA TTATACTGGG ACAATGCCAA TAGCGACCTT 1440
GATCTTTACC TCTACGATCC CAATGGAAAC CAGGTTGACT ACTCTTACAC CGCCTACTAT 1500
GGATTGCGAAA AGGTTGGTTA TTACAACCCA ACTGATGGAA CATGGACAAT TAAGGTTGTA 1560
AGCTACAGCG GAAGTGCAAA CTATCAAGTA GATGTGGTAA GTGATGGTTC CCTTTCACAG 1620
CCTGGAAGTT CACCATCTCC ACAACCAGAA CCAACAGTAG ACGCAAAGAC GTTCCAAGGA 1680
TCCGATCACT ACTACTATGA CAGGAGCGAC ACCTTTACAA TGACCGTTAA CTCTGGGGCT 1740
ACAAAGATTA CTGGAGACCT AGTGTGTTGAC ACAAGCTACC ATGATCTTGA CCTTTACCTC 1800
TACGATCCTA ACCAGAAGCT TGTAGATAGA TCGGAGAGTC CCAACAGCTA CGAACACGTA 1860
GAATACTTAA CCCCCGCCCC AGGAACCTGG TACTTCCTAG TATATGCCTA CTACACTTAC 1920
GGTTGGGCTT ACTACGAGCT GACGGCTAAA GTTTATTATG GC 1962

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

- (A) LÄNGE: 654
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:16:

```

Met Lys Gly Leu Lys Ala Leu Ile Leu Val Ile Leu Val Leu Gly
                    5                               10
Leu Val Val Gly Ser Val Ala Ala Ala Pro Glu Lys Lys Val Glu
                    20                               25                               30
Gln Val Arg Asn Val Glu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Thr Pro Gly
                    35                               40                               45
Leu Phe Arg Lys Ile Gln Lys Leu Asn Pro Asn Glu Glu Ile Ser
                    50                               55                               60
Thr Val Ile Val Phe Glu Asn His Arg Glu Lys Glu Ile Ala Val
                    65                               70                               75
Arg Val Leu Glu Leu Met Gly Ala Lys Val Arg Tyr Val Tyr His
                    80                               85                               90
Ile Ile Pro Ala Ile Ala Ala Asp Leu Lys Val Arg Asp Leu Leu
                    95                               100                              105
Val Ile Ser Gly Leu Thr Gly Gly Lys Ala Lys Leu Ser Gly Val
                    110                              115                              120
Arg Phe Ile Gln Glu Asp Tyr Lys Val Thr Val Ser Ala Glu Leu
                    125                              130                              135
Glu Gly Leu Asp Glu Ser Ala Ala Gln Val Met Ala Thr Tyr Val
                    140                              145                              150
Trp Asn Leu Gly Tyr Asp Gly Ser Gly Ile Thr Ile Gly Ile Ile
                    155                              160                              165
Asp Thr Gly Ile Asp Ala Ser His Pro Asp Leu Gln Gly Lys Val
                    170                              175                              180
Ile Gly Trp Val Asp Phe Val Asn Gly Arg Ser Tyr Pro Tyr Asp

```

	185		190		195
Asp His Gly His	Gly Thr His Val Ala Ser Ile Ala Ala Gly Thr				
	200		205		210
Gly Ala Ala Ser	Asn Gly Lys Tyr Lys Gly Met Ala Pro Gly Ala				
	215		220		225
Lys Leu Ala Gly	Ile Lys Val Leu Gly Ala Asp Gly Ser Gly Ser				
	230		235		240
Ile Ser Thr Ile	Ile Lys Gly Val Glu Trp Ala Val Asp Asn Lys				
	245		250		255
Asp Lys Tyr Gly	Ile Lys Val Ile Asn Leu Ser Leu Gly Ser Ser				
	260		265		270
Gln Ser Ser Asp	Gly Thr Asp Ala Leu Ser Gln Ala Val Asn Ala				
	275		280		285
Ala Trp Asp Ala	Gly Leu Val Val Val Val Ala Ala Gly Asn Ser				
	290		295		300
Gly Pro Asn Lys	Tyr Thr Ile Gly Ser Pro Ala Ala Ala Ser Lys				
	305		310		315
Val Ile Thr Val	Gly Ala Val Asp Lys Tyr Asp Val Ile Thr Ser				
	320		325		330
Phe Ser Ser Arg	Gly Pro Thr Ala Asp Gly Arg Leu Lys Pro Glu				
	335		340		345
Val Val Ala Pro	Gly Asn Trp Ile Ile Ala Ala Arg Ala Ser Gly				
	350		355		360
Thr Ser Met Gly	Gln Pro Ile Asn Asp Tyr Tyr Thr Ala Ala Pro				
	365		370		375
Gly Thr Ser Met	Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ile Ala Ala Leu				
	380		385		390
Leu Leu Gln Ala	His Pro Ser Trp Thr Pro Asp Lys Val Lys Thr				
	395		400		405
Ala Leu Ile Glu	Thr Ala Asp Ile Val Lys Pro Asp Glu Ile Ala				
	410		415		420
Asp Ile Ala Tyr	Gly Ala Gly Arg Val Asn Ala Tyr Lys Ala Ile				
	425		430		435
Asn Tyr Asp Asn	Tyr Ala Lys Leu Val Phe Thr Gly Tyr Val Ala				
	440		445		450
Asn Lys Gly Ser	Gln Thr His Gln Phe Val Ile Ser Gly Ala Ser				
	455		460		465
Phe Val Thr Ala	Thr Leu Tyr Trp Asp Asn Ala Asn Ser Asp Leu				
	470		475		480
Asp Leu Tyr Leu	Tyr Asp Pro Asn Gly Asn Gln Val Asp Tyr Ser				
	485		490		495
Tyr Thr Ala Tyr	Tyr Gly Phe Glu Lys Val Gly Tyr Tyr Asn Pro				
	500		505		510
Thr Asp Gly Thr	Trp Thr Ile Lys Val Val Ser Tyr Ser Gly Ser				
	515		520		525
Ala Asn Tyr Gln	Val Asp Val Val Ser Asp Gly Ser Leu Ser Gln				
	530		535		540
Pro Gly Ser Ser	Pro Ser Pro Gln Pro Glu Pro Thr Val Asp Ala				
	545		550		555
Lys Thr Phe Gln	Gly Ser Asp His Tyr Tyr Tyr Asp Arg Ser Asp				
	560		565		570
Thr Phe Thr Met	Thr Val Asn Ser Gly Ala Thr Lys Ile Thr Gly				
	575		580		585
Asp Leu Val Phe	Asp Thr Ser Tyr His Asp Leu Asp Leu Tyr Leu				
	590		595		600
Tyr Asp Pro Asn	Gln Lys Leu Val Asp Arg Ser Glu Ser Pro Asn				
	605		610		615
Ser Tyr Glu His	Val Glu Tyr Leu Thr Pro Ala Pro Gly Thr Trp				
	620		625		630
Tyr Phe Leu Val	Tyr Ala Tyr Tyr Thr Tyr Gly Trp Ala Tyr Tyr				
	635		640		645
Glu Leu Thr Ala	Lys Val Tyr Tyr Gly				
	650				

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:17:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

- (A) LÄNGE: 25
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nukleinsäure (synthetische DNA)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:17:

TCTGAATTCG TTCTTTTCTG TATGG

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:18:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

- (A) LÄNGE: 20
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nukleinsäure (synthetische DNA)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:18:

TGTACTGCTG GATCCGGCAG

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:19:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

- (A) LÄNGE: 25
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nukleinsäure (synthetische DNA)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:19:

AGAGGCATGC GTATCCATCA GATTTTGTGAG

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:20:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

- (A) LÄNGE: 20
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nukleinsäure (synthetische DNA)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:20:

AGTGAACGGA TACTTGGAAC

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:21:



- (A) LÄNGE: 29
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nukleinsäure (synthetische DNA)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:25:

GAGAGCTTTC AGCCCCTTCA TNNNNNNTCC GGCAGCCTGC GCAGACATG 29

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:26:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN
  - (A) LÄNGE: 27
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nukleinsäure (synthetische DNA)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:26:

AGAGGGGGAT CCGTGAGAAG CAAAAAA 27

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:27:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN
  - (A) LÄNGE: 20
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nukleinsäure (synthetische DNA)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:27:

GATGACTAGT AAGTCTCTAA 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:28:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN
  - (A) LÄNGE: 20
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nukleinsäure (synthetische DNA)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:28:

AAGCCTGAGG TTGTTGCTCC 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:29:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN
  - (A) LÄNGE: 29
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nukleinsäure (synthetische DNA)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:29:

GGGCATGCTC ATGAACTCC AGGCTGTGA

29

### Patentansprüche

1. Protease, bestehend aus einer Aminosäuresequenz, in der ein oder mehrere Aminosäurereste von dem C-Terminus der in SEQ ID NO:4 des Sequenzprotokolls wiedergegebenen Aminosäuresequenz deletiert ist/sind und die eine thermostabile Protease-Aktivität besitzt.

2. Protease nach Anspruch 1, die aus der in SEQ ID NO:1 des Sequenzprotokolls wiedergegebenen Aminosäuresequenz besteht.

3. Gen, das für ein Protein kodiert, das aus einer Aminosäuresequenz besteht, in der ein oder mehrere Aminosäurereste von dem C-Terminus der in SEQ ID NO:4 des Sequenzprotokolls wiedergegebenen Aminosäuresequenz deletiert ist/sind und das eine thermostabile Protease-Aktivität besitzt.

4. Protease-Gen nach Anspruch 3, das für die in SEQ ID NO:1 des Sequenzprotokolls wiedergegebene Aminosäuresequenz kodiert.

5. Protease-Gen nach Anspruch 4, die aus der in SEQ ID NO:2 des Sequenzprotokolls wiedergegebenen Basensequenz besteht.

6. Protease-Gen, das mit dem Protease-Gen nach Anspruch 5 hybridisiert, unter Bedingungen, die durch 6×SSC, das 0,5% SDS, 0,1% bovines Serumalbumin (BSA), 0,1% Polyvinylpyrrolidon, 0,1% Ficoll 400, 0,01% denaturierte Lachsspermien-DNA enthält, bei 50°C definiert sind und das für ein Protein mit einer thermostabilen Protease-Aktivität kodiert.

7. Gen, das für eine Aminosäuresequenz kodiert, die durch Formel I wiedergegeben ist:

SIG-Ala-Gly-Gly-Asn-PRO

[I],

worin SIG eine Aminosäuresequenz eines Signalpeptids wiedergibt, das von einem Subtilisin abgeleitet ist und PRO die Aminosäuresequenz der Protease nach Anspruch 1 oder 2 umfasst.

8. Plasmidvektor, umfassend das Gen nach Anspruch 7.

9. Plasmidvektor nach Anspruch 8, der pSPO124ΔC (FERM BP-6294) ist.

10. Verfahren zur Herstellung eines Proteins, umfassend das Kultivieren eines Bakteriums des Genus Bacillus, in welches der Plasmidvektor nach Anspruch 8 oder 9 eingeführt ist, und Isolieren des Proteins von Interesse aus der Kultur.

11. Verfahren zur Herstellung eines Proteins nach Anspruch 10, wobei das Bakterium des Genus Bacillus Bacillus subtilis ist.

12. Verfahren zur Herstellung eines Proteins nach Anspruch 10, wobei ein Plasmid pSP0124 Δ C (FERM BP-6294) in das Bakterium des Genus Bacillus eingeführt wird.

13. Verfahren zur Herstellung eines Proteins nach Anspruch 12, umfassend das Kultivieren von Bacillus subtilis DB 104/pSPO124 Δ C FERM BP-6294 und das Isolieren des Proteins von Interesse aus der Kultur.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

Fig. 1

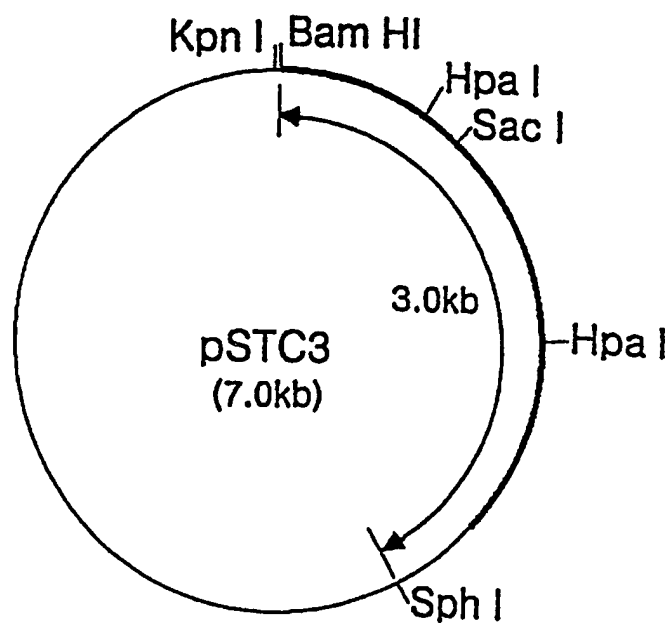


Fig. 2

PFUL	10	20	30	40	50
TCES	MNKKGLTVLF	IAIMLLSVVP	VHFVSAETPP	VSSENSTTSI	LPNQQVVTKE
subtilisin		MKRLGAVV	LALVLVGLLA	GTALAAPVKP	VVRNNAVQOK
					MRGKKVWISL
PFUL	60	70	80	90	100
TCES	VSQAALNAIM	KGQPNMVLII	KTKEGKLEEA	KTELEKLGAE	ILDENRVLNM
subtilisin					LRLMGAQVKY
					MSAAKKKDDVI
PFUL	110	120	130	140	150
TCES	LLVKIKPEKV	KELNYISSLE	KAWLNREVKL	SPPIVEKDVK	TKEPSLEPKM
subtilisin					QEDYKQVDD
					DHVAHAYAQS
PFUL	160	170	180	190	200
TCES	YNSTWVINAL	QFIQEFQYDG	SGVAVVAVLDT	GVDPNHPPFIS	ITPDGRRKII
subtilisin					GKVIQWYDAV
					VAGGASMVPS
PFUL	210	220	230	240	250
TCES	EMKDFTDEGF	VDTSFSFSKV	VNGTLIINTT	FQVASGLTLN	ESTGLMEYVV
subtilisin					
PFUL	260	270	280	290	300
TCES	KTVVVSNTVI	GNITSANGIY	HFGLLPERYF	DLNFDGDQED	FYPVLLVNST
subtilisin					

Fig. 3

	310	320	330	340	350
PFUL	GNGYDIAYVD	TDLDYDFTDE	VPLGQYVITY	DVAVFSYYYG	PLNYVLAEID
TCES	-----	-----	-----	-----	-----
subtilisin	-----	-----	-----	-----	-----
	360	370	380	390	400
PFUL	PNGEYAVFGW	DGHGCHTHVA	GIVAGYDSNN	DAWDWLSMYS	GEWEVFSRLY
TCES	-----	GHGTHVA	GIVAGTGSVN	SQ	-----
subtilisin	-----	SHGTHVA	GIVAA--LNN	SI	-----
	410	420	430	440	450
PFUL	GWDYTNVTTD	TVQGVARGAQ	IMAIRVLRSP	GRGSMWDITE	GMTYAAATHGA
TCES	-----	YIGVAPGAK	LVGKVLGAD	GSGSVSTIIA	CVDWVVQNKD
subtilisin	-----	GVLGVAPPSAS	LYAVKVLGAD	GSGQYSWILIN	GLEWALANNM
	460	470	480	490	500
PFUL	---DVTISMS	LGGNAPYLDG	DDPESVAVDE	LTEKYGVVFEV	IAAGNEGPGI
TCES	KYGIKVINLS	LGSSQSS-DG	DDSLSQAVNN	AWDA-GIVVC	VAAAGN[SG]PNT
subtilisin	---DVTINMS	LGGP-----SG	SAA[KA]AVDK	AVAS-GVVV	AAAGNEGTSG
	510	520	530	540	550
PFUL	N--IVGSPGV	ATKATVGGAA	AVPINVGYYV	SQALGYPDYY	GFYYFPAYTN
TCES	Y--TVGSPAA	ASKVITVGAV	DSNDN-----	-----	-----
subtilisin	SSSTVGYPGK	YPSVITVGAV	DSNQ-----	-----	-----
	560	570	580	590	600
PFUL	VRIAEFSSRG	PRIDGEIKEN	VVAPGYGIVS	SLEMMWIGGAD	F-----MS
TCES	---IASFSSRC	PTADGRLKPE	VVAPGVDTIIA	PRASGTSMTG	PINDYYTKAS
subtilisin	---RASFSVVC	PELD-----	VVAPGVSIQS	TLEGNKYGA-	-----YN

Fig. 4

PFUL	610	620	630	640	650
TCES	subtilisin	subtilisin	subtilisin	subtilisin	subtilisin
PFUL	660	670	680	690	700
TCES	subtilisin	subtilisin	subtilisin	subtilisin	subtilisin
PFUL	710	720	730	740	750
TCES	subtilisin	subtilisin	subtilisin	subtilisin	subtilisin
PFUL	760	770	780	790	800
TCES	subtilisin	subtilisin	subtilisin	subtilisin	subtilisin
PFUL	810	820	830	840	850
TCES	subtilisin	subtilisin	subtilisin	subtilisin	subtilisin
PFUL	860	870	880	890	900
TCES	subtilisin	subtilisin	subtilisin	subtilisin	subtilisin
PFUL	910	920	930	940	950
TCES	subtilisin	subtilisin	subtilisin	subtilisin	subtilisin

PFUL	960	970	980	990	1000
	GEFFIKGIEV	PEGTAELKIR	IGNPSVPNSD	LDLYLYDSKG	NLVALDGNPT
PFUL	1010	1020	1030	1040	1050
	AEEVVVEYP	KPGVYSIVVH	GYSVRDENG	PTTTTFDLVV	QMTLDNGNIK
PFUL	1060	1070	1080	1090	1100
	LDKDSIILGS	NESVVVTANI	TIDRDHPTGV	YSGIIEIRDN	EVIQDTNTSI
PFUL	1110	1120	1130	1140	1150
	AKIPITLVID	KADFAVGLTP	AEGVLGEARN	YTLIVKHALT	LEPVPNATVI
PFUL	1160	1170	1180	1190	1200
	IGNYTYLTDE	NGTVFTYAP	TKLGSDEITV	IVKKENFNTL	EKTFQITVSE
PFUL	1210	1220	1230	1240	1250
	PEITEEDINE	PKLAMSSPEA	NATIVSVEME	SEGGVKKTVT	VEITINGTAN
PFUL	1260	1270	1280	1290	1300
	ETATIVVPVP	KKAENIEVSG	DHVISYSIEE	GEYAKYVIIT	VKFAASPVTVT
PFUL	1310	1320	1330	1340	1350
	VITYIYAGPR	VSILTILNFLG	YSWYRLYSQK	FDELYQKALE	LGVDNETLAL
PFUL	1360	1370	1380	1390	1400
	ALSYHEKAKE	YYEKALELSE	GNIIQYLGDI	RLLPPLRQAY	INEMKAVKIL
PFUL	1410				
	EKAIEELEGE	E*			

Fig. 5

Fig. 6

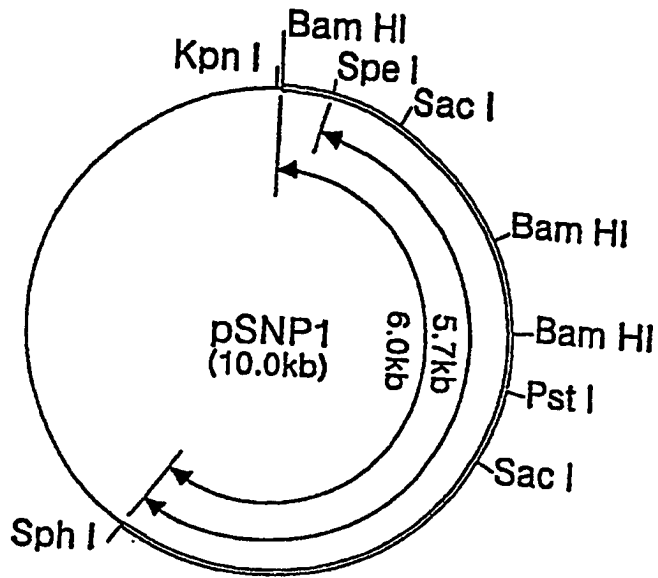


Fig. 7

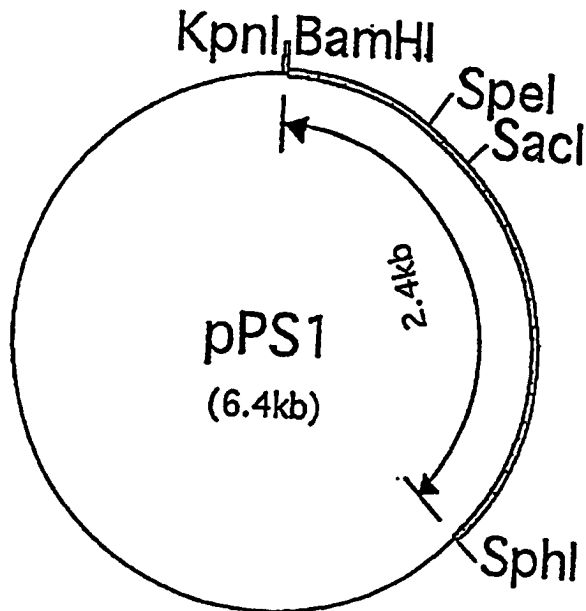


Fig. 8

