



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103687947 B

(45)授权公告日 2016.08.17

(21)申请号 201280034857.4

C12P 19/14(2006.01)

(22)申请日 2012.01.13

(56)对比文件

(30)优先权数据

CN 101287751 A,2008.10.15,

2011-155792 2011.07.14 JP

Joyce H.et al.Improving Low-Temperature Catalysis in the

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

Hyperthermostable Pyrococcus furiosus  $\alpha$ -Glucosidase CelB by Directed Evolution.

2014.01.14

《Biochemistry》.2000,3662页左栏第1-11行,表1.

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2012/050539 2012.01.13

Joyce H.et al.Improving Low-Temperature Catalysis in the

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/008480 JA 2013.01.17

Hyperthermostable Pyrococcus furiosus  $\alpha$ -Glucosidase CelB by Directed Evolution.

(73)专利权人 东丽株式会社

地址 日本东京都

《Biochemistry》.2000,3662页左栏第1-11行,表1.

(72)发明人 栗原宏征 山田胜成 石川一彦

三岛由美子 和田康史 门祐示

Fabrizio et al.DS-resistant Active and Thermostable Dimers Are Obtained from the Dissociation of Homotetrameric  $\alpha$ -Glycosidase from Hyperthermophilic Sulfolobus solfataricus in SDS.《THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY》.2002,44050-44060.

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 曾祯 段承恩

审查员 马骞

(51)Int.Cl.

C12N 15/09(2006.01)

C12N 1/15(2006.01)

C12N 1/19(2006.01)

C12N 1/21(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

C12N 9/42(2006.01)

权利要求书1页 说明书15页

序列表58页 附图5页

(54)发明名称

突变型 $\beta$ 葡糖苷酶、生物质分解用酶组合物和糖液的制造方法

(57)摘要

本发明提供在生物质存在下活性高、且比现有酶热稳定高的新 $\beta$ 葡糖苷酶。一种 $\beta$ 葡糖苷酶,其特征在于,选自相对于亲 $\beta$ 葡糖苷酶的氨基酸Glu39、Asp169、Arg170、Arg220、Tyr227、Glu330中的至少3个以上的氨基酸缺失和/或向其他氨基酸置换,且显示纤维二糖分解活性。

1. 突变型 $\beta$ 葡萄糖苷酶,由序列号14、35~38的任一者所示的氨基酸序列组成。
2. DNA,编码权利要求1所述的突变型 $\beta$ 葡萄糖苷酶。
3. 根据权利要求2所述的DNA,包含序列号20、序列号31~34的任一者所示的碱基序列。
4. 表达载体,包含权利要求2或3所述的DNA。
5. 转化细胞,通过使用了权利要求4所述的表达载体的转化而制作。
6. 生物质分解用酶组合物,包含权利要求1所述的突变型 $\beta$ 葡萄糖苷酶或权利要求5所述的转化细胞的处理物。
7. 从来源于纤维素的生物质制造糖液的方法,包含将含纤维素的生物质使用权利要求6所述的生物质分解用酶组合物进行水解的步骤。

## 突变型 $\beta$ 葡糖苷酶、生物质分解用酶组合物和糖液的制造方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及新的 $\beta$ 葡糖苷酶、包含该 $\beta$ 葡糖苷酶的生物质分解用酶组合物、和使用它们来水解来源于纤维素的生物质的糖液的制造方法。

### 背景技术

[0002] 纤维素的糖化有各种方法,但开发能量使用量少且糖收率高的酶糖化法已经成为主流。

[0003] 如果将作为纤维素分解酶的纤维素酶大致分类,则分为作用于纤维素的结晶区域的纤维二糖水解酶、从纤维素分子链内部开始作用而降低分子量的内切葡聚糖酶。已知这些纤维素酶受到作为生成物之一的纤维二糖阻抑。另外 $\beta$ -葡糖苷酶是作用于水溶性寡糖或纤维二糖,催化其 $\beta$ -糖苷键的水解反应的酶。特别是, $\beta$ -葡糖苷酶是用于充分地获得作为发酵原料有用的葡萄糖所必需的酶。另外,已知纤维二糖水解酶或内切葡聚糖酶由于纤维素分解所生成的纤维二糖的积累而发生反应阻抑。即, $\beta$ -葡糖苷酶能够大幅降低由纤维素分解而生成的纤维二糖的积累,因此具有大幅提高纤维素分解效率这样的效果。

[0004] 纤维素在草本系植物、木本系植物中大量含有,因此将这些植物总称为含纤维素的生物质。含纤维素的生物质中除了纤维素之外,还包含木聚糖、阿拉伯聚糖等半纤维素、和木质素。特别是已知由于含纤维素的生物质中所含的木质素是芳香族系的高分子化合物,因此在使用来源于丝状菌的纤维素酶的酶糖化中发挥阻抑作用。关于由木质素产生的来源于丝状菌的纤维素酶的阻抑机制目前尚未完全阐明,据说纤维素酶吸附于木质素而分解效率降低是要因之一(非专利文献1)。

[0005] 耐热性酶由于稳定性高、即使在高温条件下也长期保持活性,因此被研究了作为产业用酶的应用。确认了这样的耐热性酶在嗜热菌、或超嗜热菌所具有的酶中更多地存在。

[0006] 关于耐热性的 $\beta$ -葡糖苷酶,已经从数种嗜热菌或超嗜热菌中鉴定出,具体地,从强烈炽热球菌(*Pyrococcus furiosus*)、掘越氏热球菌(*Pyrococcus horikoshii*)、海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*)、芝田硫化叶菌(*Sulfolobus shibatae*)、硫磺矿硫化叶菌(*sulfolobus solfataricus*)、热纤梭菌(*Clostridium thermocellum*)等微生物中鉴定出了耐热性的 $\beta$ -葡糖苷酶。特别是公开了来源于热纤梭菌(*Clostridium thermocellum*)的 $\beta$ 葡糖苷酶形成单体(非专利文献2)、来源于硫磺矿硫化叶菌(*sulfolobus solfataricus*)和强烈炽热球菌(*Pyrococcus furiosus*)的 $\beta$ 葡糖苷酶形成4聚体(非专利文献3、非专利文献4),但它们的结构与其功能的关系不明确。

[0007] 现有技术文献

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献1:国际公开第2005/093072号公报

[0010] 非专利文献

[0011] 非专利文献1:Hetti P.等,Journal of Biotechnology,107,65-72(2004)

[0012] 非专利文献2:Christian P.等,Trichoderma and Gliocladium:Basic Biology,

Taxonomy and Genetics.,vol.1,121-138(1998)

[0013] 非专利文献3:Ohba H.等,Biosci.Biotech.Biochem.,59,1581-1583(1995)

[0014] 非专利文献4:Bauer MW.等,J.Biol.Chem.,vol.271,39,23749-23755(1996)

## 发明内容

[0015] 发明所要解决的课题

[0016] 本发明的课题在于提供高度地保持在含纤维素的生物质的水解中的酶活性的β葡糖苷酶。

[0017] 用于解决课题的方法

[0018] 本发明者们为了解决上述课题,在具有序列号1所示的氨基酸序列的现有的β葡糖苷酶(以下在本说明书中称为“亲β葡糖苷酶”)的特定位置导入氨基酸突变,作为具有其功能被改良了的性质的突变体成功地获得了新的β葡糖苷酶。详细地,本发明者们着眼于亲β葡糖苷酶的三维结构,通过蛋白质晶体结构分析特定了与其4聚体的形成相关的氨基酸,通过对该氨基酸选择性地施加突变,从而成功地获得了4聚体形成被不稳定化了的新β葡糖苷酶。并且发现,本新β葡糖苷酶特别是在含纤维素的生物质的水解中具有优异的特性。

[0019] 即,本发明包含以下构成。

[0020] [1]突变型β葡糖苷酶,其特征在于,在各单体之间形成氢键或离子键的氨基酸的位置,具有使β葡糖苷酶的4聚体形成不稳定化的突变,并且,该突变型β葡糖苷酶具有与野生型相比同等或更高的纤维二糖分解活性。

[0021] [2]根据[1]的突变型β葡糖苷酶,具有与序列号1的氨基酸序列有90%以上的序列同一性的氨基酸序列,在该有90%以上的序列同一性的氨基酸序列中,包含与选自序列号1的氨基酸序列的第39位的谷氨酸、第169位的天冬氨酸、第170位的精氨酸、第220位的精氨酸、第227位的酪氨酸和第330位的谷氨酸中的至少3个以上的氨基酸相当的氨基酸的突变。。

[0022] [3]根据[1]或[2]的突变型β葡糖苷酶,具有与序列号1的氨基酸序列有90%以上的序列同一性的氨基酸序列,在该有90%以上的序列同一性的氨基酸序列中,包含与选自序列号1的氨基酸序列的第39位的谷氨酸、第169位的天冬氨酸、第170位的精氨酸、第220位的精氨酸、第227位的酪氨酸和第330位的谷氨酸中的至少3个以上的氨基酸相当的氨基酸向具有中性侧链的氨基酸的置换。

[0023] [4]根据[1]~[3]的任一项的突变型β葡糖苷酶,具有与序列号1的氨基酸序列有90%以上的序列同一性的氨基酸序列,在该有90%以上的序列同一性的氨基酸序列中,包含与序列号1的氨基酸序列的第170位的精氨酸、第220位的精氨酸和第227位的酪氨酸相当的氨基酸向具有中性侧链的氨基酸的置换。

[0024] [5]根据[3]或[4]的突变型β葡糖苷酶,具有中性侧链的氨基酸从丙氨酸、苯丙氨酸和甘氨酸中选择。

[0025] [6]根据[1]~[5]的任一项的突变型β葡糖苷酶,具有与序列号1的氨基酸序列有90%以上的序列同一性的氨基酸序列,在该有90%以上的序列同一性的氨基酸序列中,包含与序列号1的氨基酸序列的第170位的精氨酸相当的氨基酸向丙氨酸的置换、与序列号1的氨基酸序列的第220位的精氨酸相当的氨基酸向丙氨酸的置换和与序列号1的氨基酸序

列的第227位的酪氨酸相当的氨基酸向苯丙氨酸的置换。

[0026] [7]根据[1]~[6]的任一项的突变型β葡糖苷酶,包含序列号14所示的氨基酸序列。

[0027] [8]根据[1]~[7]的任一项的突变型β葡糖苷酶,进一步包含与选自序列号1的氨基酸序列的第440位的亮氨酸、第448位的精氨酸、第449位的谷氨酸、第459位的谷氨酸中的1个以上的氨基酸相当的氨基酸的突变。

[0028] [9]根据[8]的突变型β葡糖苷酶,包含选自与序列号1的氨基酸序列的第448位的精氨酸相当的氨基酸向具有中性侧链或酸性侧链的氨基酸的置换、与序列号1的氨基酸序列的第449位的谷氨酸相当的氨基酸向具有中性侧链或碱性侧链的氨基酸的置换和与序列号1的氨基酸序列的第459位的谷氨酸相当的氨基酸向具有中性侧链或碱性侧链的氨基酸的置换中的1个以上的置换。

[0029] [10]根据[8]或[9]的突变型β葡糖苷酶,包含序列号35~38的任一者所示的氨基酸序列。

[0030] [11]DNA,编码[1]~[10]的任一项的突变型β葡糖苷酶。

[0031] [12]根据[11]的DNA,包含序列号20、序列号31~34的任一者所示的碱基序列。

[0032] [13]表达载体,包含[11]或[12]的DNA。

[0033] [14]转化细胞,通过使用了[13]的表达载体的转化而制作。

[0034] [15]生物质分解用酶组合物,包含[1]~[10]的任一项的突变型β葡糖苷酶或[14]的转化细胞的处理物。

[0035] [16]从来源于纤维素的生物质制造糖液的方法,包含将含纤维素的生物质使用[15]的生物质分解用酶组合物进行水解的步骤。

[0036] 本说明书包含作为本申请的优先权基础的日本专利申请2011-155792号的说明书和/或附图所记载的内容。

[0037] 发明的效果

[0038] 根据本发明,可以提供在含纤维素的生物质存在下的葡糖苷酶活性被改良了的新的突变型β葡糖苷酶。本发明的β葡糖苷酶优选在利用含纤维素的生物质的水解的糖液的制造中使用。

## 附图说明

[0039] 图1显示亲β葡糖苷酶的晶体结构分析的结果所得到的亲β葡糖苷酶的带状模型。

[0040] 图2是亲β葡糖苷酶的亚基A-B之间的相互作用部位的扩大带状模型。

[0041] 图3是亲β葡糖苷酶和导入了各种突变的β葡糖苷酶的利用蓝色非变性PAGE的电泳的结果。

[0042] 图4是突变型β葡糖苷酶的晶体结构分析的结果所得到的突变型β葡糖苷酶的带状模型。

[0043] 图5是亲β葡糖苷酶、和突变型β葡糖苷酶的利用凝胶过滤的分子量测定的结果。

## 具体实施方式

[0044] 以下,详细说明本发明,但本发明不限于这些。

[0045] (1)β葡萄糖苷酶

[0046] 在本发明中，“β葡萄糖苷酶”是指催化糖的β-糖苷键的水解反应的酶。β葡萄糖苷酶以纤维二糖的分解活性高为特征。纤维二糖分解活性的测定可以如下进行：例如在溶解于50mM乙酸-乙酸钠缓冲液(pH值5.0)中的纤维二糖的底物溶液中添加酶液，在30~85℃反应30分钟反应后，根据需要使pH值变化等来停止反应，然后使用葡萄糖定量试剂盒，定量反应液中的葡萄糖浓度。作为β葡萄糖苷酶，可例示归属于EC编号：EC3.2.1.21的酶群，但只要保有上述的纤维二糖分解活性，则都包含在本发明中的“β葡萄糖苷酶”中。

[0047] (2)亲β葡萄糖苷酶

[0048] 在本说明书中，亲β葡萄糖苷酶是指具有序列号1所示的氨基酸序列的β葡萄糖苷酶，是显示纤维二糖分解活性的酶。在本说明书中，有时将“亲β葡萄糖苷酶”记载为“野生型”。此时，“亲β葡萄糖苷酶”和“野生型”的记载可互换使用。

[0049] 亲β葡萄糖苷酶是来源于强烈炽热球菌的酶。强烈炽热球菌是以80-110℃为最适生长温度的被分类为古细菌的微生物，强烈炽热球菌是能够同化淀粉、纤维素、麦芽糖、普鲁兰多糖等各种碳源的微生物。

[0050] 亲β葡萄糖苷酶是由Kengen等(Eur. J. Biochem. 213, 305-312, 1993年)最先分离纯化的酶。根据本文献，明示了亲β葡萄糖苷酶以在水溶液中的分子量为约230kDa的同型4聚体存在。另外，明示了可以通过SDS等表面活性剂破坏该4聚体，各单体约为58kDa。进而，记载亲β葡萄糖苷酶的最适pH值为5.0，等电点为4.4，最适反应温度为102-105℃。序列号1所示的亲β葡萄糖苷酶的氨基酸序列基于由Voorhorst等(J. Bacteriol. 177, 24, 7105-7111, 1995年)鉴定的氨基酸序列。记载基于该氨基酸序列的其分子量为约54kDa(54.58kDa)。

[0051] (3)本发明的突变型β葡萄糖苷酶

[0052] 本发明的突变型β葡萄糖苷酶的特征在于，在水溶液中在β葡萄糖苷酶单体之间形成氢键或离子键的氨基酸的位置，具有使β葡萄糖苷酶的4聚体形成不稳定化的突变。

[0053] 本发明的突变型β葡萄糖苷酶的特征在于，在水溶液中，以与由亲β葡萄糖苷酶本来形成的4聚体相比被不稳定化的4聚体存在。已知亲β葡萄糖苷酶作为一级结构约为54kDa，但在水溶液中形成稳定的4聚体，作为分子量200kDa以上的分子而溶解(Bauer MW. 等, "Comparison of a β-glucosidase and αβ-mannosidase from the hyperthermophilic archaeon Pyrococcus furiosus" J. Biol. Chem., vol. 271, 39, 23749-23755(1996))。

[0054] 本发明的突变型β葡萄糖苷酶在水溶液中形成不稳定的4聚体，可以由水溶液中的分子量小于200kDa来确认。具体地，通过利用非变性PAGE的手法确认其分子量，结果以小于160kDa的分子量被检出。水溶液中4聚体不稳定化，可以通过使用除非变性PAGE以外的手法(例如、凝胶过滤分析、超离心分析等)，比较亲β葡萄糖苷酶与本发明的突变型β葡萄糖苷酶在水溶液中的行为来确认，具体地，可以通过与水溶液中亲β葡萄糖苷酶的分子量相比本发明的β葡萄糖苷酶的分子量小来确认。

[0055] 如下述实施例中详述的那样，本发明者们通过晶体结构分析，明确了在亲β葡萄糖苷酶的氨基酸序列、即序列号1所示的氨基酸序列中，第39位的谷氨酸(以下记载为"Glu39")、第169位的天冬氨酸(以下记载为"Asp169")、第170位的精氨酸(以下记载为"Arg170")、第220位的精氨酸(以下记载为"Arg220")、第227位的酪氨酸(以下记载为"Try227")和第330位的谷氨酸(以下记载为"Glu330")与亲β葡萄糖苷酶在水溶液中的4聚体形成有关。即，得知

了这些氨基酸是与其他亲葡糖苷酶的单体在水溶液中形成氢键或离子键,与4聚体的形成强烈相关的氨基酸。本发明中向β葡糖苷酶导入氨基酸突变的目的在于通过破坏与4聚体的形成有关的氨基酸的氢键或离子键,其结果使水溶液中的β葡糖苷酶的4聚体结构不稳定化。

[0056] 本发明中的β葡糖苷酶的氨基酸突变包含与β葡糖苷酶的水溶液中的4聚体形成相关的氨基酸的置换和/或缺失。

[0057] 优选本发明的突变型β葡糖苷酶具有与序列号1的氨基酸序列有90%、95%、99%、或其以上的序列同一性的氨基酸序列,在该有序列同一性的氨基酸序列中,包含与选自序列号1的氨基酸序列的Glu39、Asp169、Arg170、Arg220、Tyr227和Glu330的氨基酸的至少3个以上的氨基酸相当的氨基酸向具有中性侧链的氨基酸的置换。

[0058] “与序列号1的氨基酸序列有90%、95%、99%、或其以上的序列同一性的氨基酸序列”至少保持序列号1的氨基酸序列所示的β葡糖苷酶的活性。

[0059] 这里“相当的氨基酸”是指在将上述有序列同一性的氨基酸序列与序列号1的氨基酸序列的立体结构进行比较的情况下,在上述有序列同一性的氨基酸序列中,存在于与序列号1的氨基酸序列中的Glu39、Asp169、Arg170、Arg220、Tyr227和Glu330同样的位置,与β葡糖苷酶的水溶液中的4聚体形成相关的氨基酸。“相当的氨基酸”的氨基酸种类可以与序列号1的氨基酸序列中的Glu39、Asp169、Arg170、Arg220、Tyr227和Glu330分别相同。

[0060] 进一步优选本发明的突变型β葡糖苷酶具有与序列号1的氨基酸序列有90%、95%、99%、或其以上的序列同一性的氨基酸序列,在该有序列同一性的氨基酸序列中,包含与序列号1的氨基酸序列的Arg170、Arg220和Tyr227的氨基酸相当的氨基酸向具有中性侧链的氨基酸的置换。

[0061] 作为“具有中性侧链的氨基酸”,可列举甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸。优选“具有中性侧链的氨基酸”从丙氨酸、苯丙氨酸和甘氨酸中选择。

[0062] 如下述实施例中所述的那样,本发明者们通过晶体结构分析弄清楚了,在亲β葡糖苷酶中,序列号1所示的氨基酸序列中的Arg170与在水溶液中形成4聚体的其他全部亲葡糖苷酶单体中的Arg170形成氢键或离子键。即,通过对Arg170导入突变,可以有效地破坏与4聚体形成相关的氢键或离子键。另外,如下述实施例中所述的那样,本发明者们通过晶体结构分析弄清楚了,在亲β葡糖苷酶中,水溶液中Arg220与形成4聚体的其他单体中的第44位的甘氨酸(Gly44)形成氢键;另外,Tyr227与形成4聚体的其他单体中的第165位的赖氨酸(Lys165)形成氢键。即,在序列号1所示的氨基酸序列中,除了Arg170之外,可以通过对Arg220和Tyr227导入突变,来有效地破坏与4聚体形成相关的氢键或离子键,从而可以使水溶液中的β葡糖苷酶的4聚体结构不稳定化。

[0063] 因此优选本发明的突变型β葡糖苷酶具有与序列号1的氨基酸序列有90%、95%、99%、或其以上的序列同一性的氨基酸序列,在该有序列同一性的氨基酸序列中,包含与序列号1的氨基酸序列的Arg170相当的氨基酸向丙氨酸的置换、与Arg220相当的氨基酸向丙氨酸的置换和与Tyr227相当的氨基酸向苯丙氨酸的置换。

[0064] 特别优选本发明的突变型β葡糖苷酶包含序列号14所示的氨基酸序列。

[0065] 本发明的突变型β葡糖苷酶只要能够保持纤维二糖分解活性即可,具有与序列号1

的氨基酸序列有90%、95%、99%、或其以上的序列同一性的氨基酸序列,在该有序列同一性的氨基酸序列中,除了与序列号1的氨基酸序列的Glu39、Asp169、Arg170、Arg220、Tyr227和Glu330相当的氨基酸以外的位置也可以具有一个或多个氨基酸突变。这里“多个”是指2~10个、优选2~5个、进一步优选2~3个,“氨基酸突变”包含氨基酸的置换、缺失、插入和/或添加。

[0066] 本发明的突变型β葡糖苷酶与亲β葡糖苷酶相比,显示在含纤维素的生物质存在下的β葡糖苷酶活性提高这样的改良了的优异性质。推定该改良了的优异性质的原因是,亲β葡糖苷酶在水溶液中形成稳定的4聚体,与此相对本发明的突变型β葡糖苷酶通过上述突变导入而4聚体结构不稳定化。

[0067] 在本说明书中,有时将本发明的突变型β葡糖苷酶记载为“突变体”。此时,“突变型β葡糖苷酶”和“突变体”的记载可互换使用。

[0068] 前述的本发明的突变型β葡糖苷酶具有与序列号1的氨基酸序列有90%、95%、99%、或其以上的序列同一性的氨基酸序列,在该有序列同一性的氨基酸序列中,包含与选自序列号1的氨基酸序列的Glu39、Asp169、Arg170、Arg220、Tyr227和Glu330的氨基酸中的至少3个以上的氨基酸相当的氨基酸向具有中性侧链的氨基酸的置换,通过这些突变的效果可以使4聚体不稳定化,也可以在这些突变体中进一步进行突变导入。作为突变导入的目的,可以例示以进一步活性提高为目的的突变、以热稳定性提高为目的的突变、以进一步使多聚体结构不稳定化为目的的突变等。

[0069] 如下述实施例中详述的那样,本发明者们对于前述的突变型β葡糖苷酶进一步实施了晶体结构分析,结果弄清楚了本发明的突变型β葡糖苷酶形成2聚体结构。与该突变型β葡糖苷酶的2聚体结构形成相关的氨基酸是与序列号1的氨基酸序列的第440位的亮氨酸、第448位的精氨酸、第449位的谷氨酸、第459位的精氨酸相当的4个氨基酸。即,这4个氨基酸与形成2聚体另一个突变型葡糖苷酶的氨基酸形成氢键或离子键,与突变型葡糖苷酶的2聚体的形成强烈相关。在本发明中,除了前述的使4聚体不稳定化的突变之外,还可以进一步加入使突变型葡糖苷酶形成的2聚体不稳定化的突变。

[0070] 即,本发明的突变型β葡糖苷酶除了前述的使4聚体不稳定化的突变之外,可以进一步包含与选自序列号1的氨基酸序列的第440位的亮氨酸、第448位的精氨酸、第449位的谷氨酸、第459位的谷氨酸中的1个以上的氨基酸相当的氨基酸的突变。

[0071] 这里“相当的氨基酸”是指在将上述有序列同一性的氨基酸序列与序列号1的氨基酸序列的立体结构进行比较的情况下,在上述有序列同一性的氨基酸序列中,在与序列号1的氨基酸序列的第440位的亮氨酸、第448位的精氨酸、第449位的谷氨酸、第459位的谷氨酸同样的位置存在、且与突变型β葡糖苷酶的2聚体形成相关的氨基酸。

[0072] 特别优选在所述的突变型β葡糖苷酶的氨基酸序列中,包含选自与序列号1的氨基酸序列的第448位的精氨酸相当的氨基酸向具有中性侧链或酸性侧链的氨基酸的置换、或与第449位的谷氨酸相当的氨基酸向具有中性侧链或碱性侧链的氨基酸的置换、与第459位的精氨酸相当的氨基酸向具有中性侧链或碱性侧链的氨基酸的置换中的1个以上的氨基酸位置中的置换。

[0073] 作为“具有中性侧链的氨基酸”,可列举甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色



氨酸。优选“具有中性侧链的氨基酸”从丙氨酸、苯丙氨酸和甘氨酸中选择。

[0074] 作为“具有酸性侧链的氨基酸”，从谷氨酸、天冬氨酸中选择。

[0075] 作为“具有碱性侧链的氨基酸”，从精氨酸、赖氨酸、组氨酸中选择。

[0076] 最优选在前述的突变型β葡糖苷酶的氨基酸序列中，包含选自与序列号1的氨基酸序列的第448位的精氨酸相当的氨基酸向谷氨酸或甘氨酸的突变、与序列号1的氨基酸序列的第449位的谷氨酸相当的氨基酸向精氨酸的突变、与序列号1的氨基酸序列的第459位的精氨酸相当的氨基酸向甘氨酸的突变中的1个以上的突变。

[0077] 特别优选本发明的突变型β葡糖苷酶包含序列号31~34所示的氨基酸序列。

[0078] 另外，除了这样的通过氨基酸置换的突变之外，还可以使与序列号1的氨基酸序列的第440位以后的全部氨基酸相当的区域、或者与序列号1的氨基酸序列的第448位以后的全部氨基酸相当区域、或者与序列号1的氨基酸序列的第449位以后的全部氨基酸相当的区域、或者与序列号1的氨基酸序列的第459位以后的全部氨基酸相当的区域缺失(删除)。这是因为，与第440位以后的氨基酸相当的序列对纤维二糖分解活性本身没有特别的影响。要进行这样的缺失(删除)的情况下，可以在与要删除的氨基酸的位置对应的基因中插入终止密码子。

[0079] (4)本发明的突变型β葡糖苷酶的制造方法

[0080] 作为制造本发明的突变型β葡糖苷酶的方法，例如可以制备编码β葡糖苷酶的氨基酸序列的DNA，将其与表达载体连接，将表达载体导入宿主中，作为异种蛋白质生产，通过分离和纯化，从而获得。

[0081] 首先作为上述的DNA的制备方法，可例示：通过基因合成来全合成编码目的的氨基酸序列的DNA的方法；对编码与序列号1的氨基酸序列有90%、95%、99%、或其以上的序列同一性的氨基酸序列的DNA，通过定点突变法而在上述规定的位置导入突变的方法。编码与序列号1的氨基酸序列有90%、95%、99%、或其以上的序列同一性的氨基酸序列的基因可以通过从保有该β葡糖苷酶的微生物、特别是强烈耐热球菌依据公知的方法来分离DNA，利用PCR等手法进行DNA扩增，从而获得。

[0082] 可以通过将如上所述制备的编码突变型β葡糖苷酶的DNA，使用限制性酶和DNA连接酶连接于适当的表达载体中的启动子下游，从而制造包含该DNA的表达载体。作为表达载体，可列举细菌质粒、酵母质粒、噬菌体DNA(λ噬菌体等)、逆转录病毒、棒状病毒、牛痘病毒、腺病毒等病毒DNA、SV40的衍生物等、作为植物细胞用的载体的农杆菌等，只要能够在宿主细胞中复制和生存则其他任何载体都可以使用。例如，在宿主是大肠杆菌的情况下，可例示pUC、pET、pBAD等。另外，在宿主是酵母的情况下，可列举pPink-HC、pPink-LC、pPinkα-HC、pPCIZ、pPCIZα、pPCI6、pPCI6α、pFLD1、pFLD1α、pGAPZ、pGAPZα、pPIC9K、pPIC9等。

[0083] 作为启动子，只要是与基因的表达中使用的宿主对应的适当启动子就可以是任何启动子。例如，在宿主是大肠杆菌的情况下，可列举lac启动子、Trp启动子、PL启动子、PR启动子等，是酵母的情况下，可列举AOX1启动子、TEF1启动子、ADE2启动子、CYC1启动子、GAL-L1启动子等。

[0084] 作为本发明中使用的宿主细胞，优选大肠杆菌、细菌细胞、酵母细胞、真菌细胞、昆虫细胞、植物细胞、动物细胞等。作为酵母细胞，可列举例如，毕赤酵母属(Pichia)、酵母属(Saccharomyces)、裂殖酵母属(Schizosaccharomyces)等。作为真菌细胞，可列举曲霉属

(*Aspergillus*)、木霉属(*Trichoderma*)等。作为昆虫细胞可列举Sf9等,作为植物细胞可列举双子叶植物等,作为动物细胞可列举CHO、HeLa、HEK293等。

[0085] 转化或转染可以通过磷酸钙法、电穿孔法等公知的方法来进行。本发明的 $\beta$ 葡糖苷酶可以在如上所述被转化或转染的宿主细胞中在启动子的控制下表达,回收产生物而获得。表达时,使宿主细胞增殖或成长至适当的细胞密度,然后通过温度位移或添加异丙基-1-硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷(IPTG)等化学诱导手段诱导启动子,将细胞进一步培养一定时间。

[0086] 在突变型 $\beta$ 葡糖苷酶被排出到细胞外的情况下,从培养基直接纯化 $\beta$ 葡糖苷酶,另外在存在于细胞外的情况下,通过超声波破碎和/或机械破碎等物理手段或细胞溶解剂等化学手段破坏细胞,然后纯化 $\beta$ 葡糖苷酶。 $\beta$ 葡糖苷酶可以组合硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、阴离子或阳离子交换层析、反相高速液相层析、亲和层析、凝胶过滤层析、电泳等技术,从而从重组细胞的培养基中部分或完全地纯化出。

[0087] (5)包含突变型 $\beta$ 葡糖苷酶的生物物质分解用酶组合物

[0088] 本发明的突变型 $\beta$ 葡糖苷酶在含纤维素的生物物质的水解中相对于亲 $\beta$ 葡糖苷酶具有高热稳定性、木质素耐性。具体地,与亲 $\beta$ 葡糖苷酶相比可以得到1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍或其以上的高的纤维二糖分解活性。

[0089] 本发明的突变型 $\beta$ 葡糖苷酶可以是纯化品,也可以是粗纯化品。

[0090] 另外,本发明的突变型 $\beta$ 葡糖苷酶可以固定化于固相。作为固相,可列举例如,聚丙烯酰胺凝胶、聚苯乙烯树脂、多孔性玻璃、金属氧化物等(不特别限于这些)。通过将本发明的突变型 $\beta$ 葡糖苷酶固定于固相,在可以连续反复使用的方面是有利的。

[0091] 进而,使用上述编码突变型 $\beta$ 葡糖苷酶的DNA进行转化后的细胞的处理物也可以作为粗纯化的突变型 $\beta$ 葡糖苷酶利用。该“转化的细胞的处理物”中包含固定化于固相的转化细胞、以及转化细胞的死菌、破碎物、和将它们固定化于固相而得的产物等。

[0092] 本发明的突变型 $\beta$ 葡糖苷酶通过与纤维素酶混合,可以作为生物物质分解用酶组合物在含纤维素的生物物质的水解中使用。这里所说的纤维素酶,只要是具有分解纤维素的活性的酶就不特别限定,也可以是一种以上的混合物。作为这样的酶,可列举例如,纤维素酶、半纤维素酶、纤维二糖水解脱酶、内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶、木聚糖酶、甘露聚糖酶等。

[0093] 上述纤维素酶优选为来源于丝状菌的纤维素酶。来源于丝状菌的纤维素酶是至少包含内切葡聚糖酶和纤维二糖水解脱酶两者的混合物。进而为了有效地进行纤维素的糖化,优选含有内切葡聚糖酶2种以上、和/或含有纤维二糖水解脱酶2种以上的来源于丝状菌的纤维素酶。作为生产上述丝状菌纤维素酶的微生物,可列举木霉属(*Trichoderma*)、曲霉属(*Aspergillus*)、纤维单胞菌属(*Cellulomonas*)、梭菌属(*Clostridium*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、腐质霉属(*Humicola*)、枝顶孢霉属(*Acremonium*)、耙齿菌属(*Irpex*)、毛霉属(*Mucor*)、篮状菌属(*Talaromyces*)等的微生物。这些微生物在培养液中产生纤维素酶,因而既可以将培养液作为未纯化的丝状菌纤维素酶直接使用,也可以将纯化培养液而制剂化的产物作为丝状菌纤维素酶混合物使用。在作为从上述培养液中纯化丝状菌纤维素酶混合物而制剂化而得的产物使用的情况下,可以使用添加了蛋白酶抑制剂、分散剂、溶解促进剂、稳定剂等除了酶以外的物质的制剂作为纤维素酶制剂。

[0094] 本发明中使用的来源于丝状菌的纤维素酶优选是来源于木霉属的纤维素酶。木霉属在培养液中产生包含至少2种以上的内切葡聚糖酶、和至少2种以上的纤维二糖水解脱酶的

纤维素酶,从这样的培养液制备的纤维素酶混合物可以在本发明中优选使用。这样的木霉属中,更优选来源于里氏木霉(*Trichoderma reesei*)的纤维素酶混合物。作为来源于里氏木霉的纤维素酶混合物,可列举来源于里氏木霉QM9414(*Trichoderma reesei* QM9414)、里氏木霉QM9123(*Trichoderma reesei* QM9123)、里氏木霉RutC-30(*Trichoderma reesei* Rut-30)、里氏木霉PC3-7(*Trichoderma reesei* PC3-7)、里氏木霉CL-847(*Trichoderma reesei* CL-847)、里氏木霉MCG77(*Trichoderma reesei* MCG77)、里氏木霉MCG80(*Trichoderma reesei* MCG80)、绿色木霉QM9123(*Trichoderma viride* QM9123)的纤维素酶混合物。另外,也可以是来源于上述木霉属、通过突变剂或紫外线照射等进行突变处理而纤维素酶生产性提高了的突变株。

[0095] 本发明的生物质分解用酶组合物可以广泛地在含纤维素的生物质的水解中使用。含纤维素的生物质只要是至少含有纤维素的物质就不限定。更具体地是甘蔗渣、玉米秸、玉米穗轴、柳枝稷、稻秸、麦秸、树木、木材、废建材、报纸、旧纸、纸浆等。这些含纤维素的生物质含有高分子芳香族化合物木质素、半纤维素等杂质,作为前处理,可以使用酸、碱、加压热水等,从而将木质素、半纤维素部分分解,将所得的含纤维素的生物质作为纤维素利用。

[0096] 本发明中的含纤维素的生物质的酶处理条件优选为处理温度40℃~60℃、处理pH值3~7、含纤维素的生物质固体成分浓度0.1~30%。通过设定在该范围,可以最大限度发挥本发明的生物质分解用酶组合物的分解效率。现有的来源于嗜热菌的葡糖苷酶也有最适反应温度在100℃附近的酶,但本发明中使用的来源于嗜热菌的葡糖苷酶在40℃~60℃也显示足够高的比活性,在纤维素酶共存下,可以有效地进行含纤维素的生物质的分解。该酶处理可以以分批式进行,也可以以连续式进行。通过这样的酶处理获得的水解物包含葡萄糖、木糖等单糖成分,因而可以作为乙醇、乳酸等的原料糖使用。

[0097] 实施例

[0098] 以下列举实施例具体地说明本发明。但本发明不限于这些实施例。

[0099] (参考例1)亲β葡糖苷酶的利用大肠杆菌的重组表达制备

[0100] 亲β葡糖苷酶的基因,完全合成具有序列号2所示的碱基序列的基因,使用Ligation High(东洋纺)与pET-11d的NcoI和BamHI连接,转化JM109(Takara)。使用含有氨苄青霉素作为抗生素的LB琼脂培养基进行筛选。通过少量提取试剂盒(キアゲン)从转化得到的JM109株中分离制作的载体pET-PfuBGL,进行碱基序列分析。用pET-PfuBGL转化表达用大肠杆菌BL21(DE3)pLysS株,制作BL21-PfuBGL株。将BL21-PfuBGL株接种于含氨苄青霉素的LB培养基10mL中,在37℃振荡培养一夜(前培养)。作为主培养,在含氨苄青霉素的LB培养基1L中接种前培养所得的菌体,振荡培养至波长600nm的吸光度OD600为0.8。然后,加入异丙基-1-硫代-β-D-半乳糖苷(IPTG)使其最终浓度为0.4mM,再在25℃培养一夜。培养后,通过离心分离回收菌体,再悬浮于50mM Tris-HCl缓冲液(pH值8.0)中。将该溶液一边冰冷却一边进行超声波破碎,将其上清作为无细胞提取液通过离心分离回收。将所得的无细胞提取液在85℃保温15分钟,使除该葡糖苷酶以外的来源于大肠杆菌的蛋白质凝集沉淀。通过离心分离除去沉淀物,将上清使用截流分子量10000的再生纤维素制透析膜(スペクトラム・ラボラトリーズ制)对50mM乙酸缓冲液(pH值5.0)进行透析。使用所得的蛋白质溶液作为亲β葡糖苷酶。制备的亲β葡糖苷酶的氨基酸序列在序列号1中记载。

[0101] (实施例1)亲β葡糖苷酶的4聚体形成部位的特定

[0102] 亲β葡萄糖苷酶(强烈炽热球菌)的X射线晶体结构已经报告(Thijis K.等, Biochem.vol.39,No.17(2000)),但分解能低至**3.3Å**,另外也没有向Protein Data Bank (PDB)注册。因此,为了确定PfuBGL的三维结构,尝试了X射线晶体结构分析。探索新的结晶化条件,以磷酸作为沉淀剂成功地进行了结晶化。用大型放射线实验设备SPring-8进行X射线衍射实验,以分解能**2.5Å**确定了PfuBGL的结构。结构确定使用分子置换法,模型分子使用具有序列号22所示的氨基酸序列的来源于サーモスファエラ・アグリガンズ(Themosphaera aggregans)的β-葡萄糖苷酶(ThAggBGY、PDB ID:1QVB)。使用结构分析用的软件CCP4\_Contact来分析亚基之间的相互作用,从而分析所得的3维结构数据。由分析的结果得到的带状模型示于图1。确认了在亚基A-B之间、A-C之间发生相互作用,形成同型4聚体(图1)。关于由分析结果所得的亚基A-B之间的相互作用,归纳于表1。

[0103] 表1

|    | 亚基 A<br>(氨基酸原子)    | 亚基 B<br>(靶氨基酸原子)  | 结合距离(Å) | 结合方式 |
|----|--------------------|-------------------|---------|------|
| 1  | Arg 170 (NH1)      | Leu166 (O)        | 3.26    | 氢键   |
| 2  | Arg 170 (NH2)      | Asp169 (OD2)      | 2.68    | 氢键   |
| 3  | Arg 220 (NH1)      | Arg220 (O)        | 3.29    | 氢键   |
| 4  | Arg 220 (NH2)      | Gly44 (O)         | 3.19    | 氢键   |
| 5  | Tyr 227 (OH)       | Lys165 (O)        | 2.65    | 氢键   |
| 6  | <i>Phe 230 (N)</i> | Glu39 (OE1)       | 2.96    | 氢键   |
| 7  | Glu 39 (OE1)       | <i>Phe230 (N)</i> | 2.6     | 氢键   |
| 8  | Ser 43 (O)         | Arg220 (NE)       | 3.39    | 氢键   |
| 9  | Gly 44 (O)         | Arg220 (NE)       | 3.39    | 氢键   |
| 10 | Gly 44 (O)         | Arg220 (NH2)      | 3.49    | 氢键   |
| 11 | Lys 165 (O)        | Tyr227 (OH)       | 2.92    | 氢键   |
| 12 | Leu 166 (O)        | Arg170 (NH1)      | 3.03    | 氢键   |
| 13 | Asp169 (OD2)       | Arg170 (NH2)      | 2.79    | 氢键   |
| 14 | Ser 229 (OG)       | Lys 165 (NZ)      | 3.54    | 氢键   |
| 15 | Arg 170 (NH2)      | Asp 169 (OD2)     | 2.68    | 离子键  |
| 16 | Asp 169 (OD2)      | Arg 170 (NH2)     | 2.79    | 离子键  |

[0104]

[0105] 在亚基之间的相互作用中,只有氨基酸主链的氮原子(N)和氧原子(O)相互作用的(斜体表示的氨基酸),由于哪个氨基酸都具有同样的结构,因而不能改变。因此,为了改变亚基之间的相互作用,考虑向侧链部分与相互作用有关的Glu39、Asp169、Arg170、Arg220、Tyr227、Glu330导入突变是有效的。另外,推定其中Arg170-Asp169之间的结合为离子键,因而与其他借助氢键的相互作用相比结合强,通过突变导入而有特别大的效果。另外,将A-B之间的相互作用部位的扩大带状模型示于图2,特别是考虑Arg170、Arg220、Tyr227的残基交界面面积大、另外结合距离也近,因而作为突变的导入部位是有力的。

[0106] (实施例2)突变体的制备

[0107] 使用表2所示的引物,通过以下的手法制作本发明的 $\beta$ 葡糖苷酶(突变体)。

[0108] 表2

[0109]

| 突变导入位点        | 碱基序列(5'→3')                              | 序列号  |
|---------------|--|------|
| Arg170Phe(Fw) | CAATTGCAGTAAGGAACTTGGGCCCGGATGCGGCTCCTGC | 序列号3 |
| Arg170Phe(Rv) | CCAGGAGCCGCATCCGGCCAAGTTTCCTTACTGCAATTG  | 序列号4 |
| Arg220Ala(Fw) | GGTTACATTAATCTAGGTTCCAGATTTCCACCAGG      | 序列号5 |
| Arg220Ala(Rv) | CCTGGTGGAAATCCTGAAGCTAGATTAATGTAACC      | 序列号6 |
| Tyr22Phe(Fw)  | GGATTTCCACCAGGATTTCTAAGCTTTGAAGC         | 序列号7 |
| Tyr227Phe(Rv) | GCTCAAAGCTTAGAAATCCTGGTGGAAATCC          | 序列号8 |

[0110] 对编码序列号1所示的氨基酸序列的基因,使用序列号3和4的碱基序列所示的寡核苷酸、使用定点突变法制作R170A突变体(序列号16)。另外同样地,使用序列号5和6的碱基序列所示的寡核苷酸制作R220A突变体(序列号17),使用序列号7和8制作Y227F突变体(序列号18)。另外,对R170A突变体,使用序列号7和8的碱基序列所示的寡核苷酸制作R170A/Y227F突变体(序列号19)。对R170A突变体,使用序列号5和6的碱基序列所示的寡核苷酸制作R170A/R220A突变体(序列号21)。对R170A/R220A突变体,使用序列号7和8的碱基序列所示的寡核苷酸制作R170A/R220A/Y227F突变体(序列号20)。

[0111] 所得的各基因按照参考例1记载的顺序在大肠杆菌中实施表达。R170A突变体、R220A突变体、Y227F突变体、R170A/Y227F突变体、R170A/R220A突变体、R170A/R220A/Y227F突变体的氨基酸序列示于序列号9~14(不包含作为起始密码子的甲硫氨酸)。确认了上述突变体全部可以在大肠杆菌中作为异种蛋白质表达。

[0112] (实施例3)突变体的纤维二糖分解活性1

[0113] 将实施例2中得到的突变体(本发明的 $\beta$ 葡糖苷酶)、和参考例1中制备的亲 $\beta$ 葡糖苷酶的纤维二糖分解活性通过以下实验进行比较。底物使用10mM纤维二糖/50mM乙酸缓冲液,分别将实施例2、参考例1中制备的酶以终浓度0.23mg/mL添加,在50℃进行酶反应30分钟。将亲 $\beta$ 葡糖苷酶在50℃的温度条件下生成的葡萄糖浓度(g/L)作为100%,将各突变体中的纤维二糖分解活性以相对值示于表3。

[0114] 表3

[0115]

| 亲 $\beta$ 葡糖苷酶 | R170A<br>突变体 | R220A<br>突变体 | Y227F<br>突变体 | R170A/Y227F<br>突变体 | R170A/R220A<br>突变体 | R170A/R220A/<br>Y227F 突变体 |
|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------------|--------------------|---------------------------|
| 100%           | 100%         | 100%         | 100%         | 100%               | 100%               | 100%                      |

[0116] 确认了在50℃亲 $\beta$ 葡糖苷酶和各突变体在活性上无差异。

[0117] (实施例5)突变体的纤维二糖分解活性2

[0118] 测定含纤维素的生物质存在下的亲 $\beta$ 葡糖苷酶和突变体(本发明的 $\beta$ 葡糖苷酶)的纤维二糖分解活性。作为含纤维素的生物质,使用将稻秸用5%稀硫酸在150℃处理10分钟后的物质。在悬浮了含纤维素的生物质5wt%的溶液中添加10mM纤维二糖/50mM乙酸缓冲液制成反应液。在该反应液中以终浓度0.23mg/mL添加实施例2、参考例1中制备的酶,在50℃进

行酶反应30分钟。将亲β葡糖苷酶在50℃的温度条件下生成的葡萄糖浓度(g/L)作为100%，将各突变体中的纤维二糖分解活性用相对值示于表4。

[0119] 表4

[0120]

| 亲β葡糖苷酶 | R170A<br>突变体 | R220A<br>突变体 | Y227F<br>突变体 | R170A/Y227F<br>突变体 | R170A/R220A<br>突变体 | R170A/R220A/<br>Y227F 突变体 |
|--------|--------------|--------------|--------------|--------------------|--------------------|---------------------------|
| 100%   | 101%         | 101%         | 98%          | 96%                | 94%                | 163%                      |

[0121] 确认了在亲葡糖苷酶和R170A突变体、R220A突变体、Y227F突变体、R170A/R220A突变体中,含纤维素的生物质存在下的纤维二糖分解活性几乎没有差异。另一方面,确认了在R170A/R220A/Y227F突变体中,相对于亲葡糖苷酶或者其他突变体活性大幅提高。

[0122] (实施例6)利用蓝色非变性PAGE的突变体的分子量测定

[0123] 通过蓝色非变性PAGE来研究亲β葡糖苷酶、和作为本发明的β葡糖苷酶的R170A突变体、R170A/R220A突变体、和R170A/R220A/Y227F突变体是否形成稳定的4聚体。

[0124] 蓝色非变性PAGE使用3-12%非变性PAGE Bis-Tris凝胶(インビトロジェン)。将亲β葡糖苷酶、R170A突变体、R170A/R220A突变体、和R170A/R220A/Y227F突变体各1μg溶解于样品缓冲液(50mM咪唑(pH值7.0)、50mM NaCl、5mM6-氨基己酸、0.5%考马斯G250、0.5%DDM)中作为电泳样品。分子量标志物使用NativeMark蛋白标准品(インビトロジェン)。电泳在阳极侧添加50mM酪氨酸、7.5mM咪唑(pH值7.0)、考马斯G250,在阴极侧添加25mM咪唑(pH值7.0),以150V定电压电泳100分钟。在条带的固定化之后,进行G-250的脱色。将所得的凝胶的照片示于图3。

[0125] 关于亲β葡糖苷酶、R170A突变体和R170A/R220A突变体,在分子量标志物146kDa至242kDa的之间大概相同的位置检测到各自的条带。由于亲β葡糖苷酶形成4聚体时的分子量为216kDa,所以可以确认它们形成了稳定的4聚体。另一方面,本发明的R170A/R220A/Y227F突变体在分子量标志物66kDa至146kDa被检出。即,确认了本发明的R170A/R220A/Y227F突变体中本来由亲β葡糖苷酶所形成的4聚体的形成不稳定化,以3聚体或者2聚体在水溶液中存在。

[0126] (实施例7)使用了包含β葡糖苷酶的生物质分解用酶组合物的含纤维素的生物质的水解

[0127] 使用来源于里氏木霉(*Trichoderma reesei*)的纤维素酶(セルクラスト、シグマ),并作为葡糖苷酶,分别使用包含比较例1中制备的亲葡糖苷酶、实施例2中制备的本发明的R170A突变体、R170A/R220A突变体、和R170A/R220A/Y227F突变体的生物质分解用酶组合物。酶添加量以纤维素酶0.5mg/mL、各种葡糖苷酶0.005mg/mL(纤维素酶的1/100量)的方式混合。

[0128] 作为含纤维素的生物质,使用将稻秸用5%稀硫酸在150℃处理10分钟而得的物质。水解使用在50mM乙酸缓冲液(pH值5.0)中悬浮5wt%的含纤维素的生物质而得的物质作为底物。反应在50℃进行28小时,测定生成的葡萄糖浓度。

[0129] 表5

[0130]

|        |      |         |           |                    |                           |
|--------|------|---------|-----------|--------------------|---------------------------|
|        | 无    | 亲β葡萄糖苷酶 | R170A 突变体 | R170A/R220A<br>突变体 | R170A/R220A/<br>Y227F 突变体 |
| 葡萄糖生成量 | 6g/L | 8.3 g/L | 8.0 g/L   | 8.6 g/L            | 11 g/L                    |

[0131] 确认了相对于无葡萄糖苷酶,通过添加葡萄糖苷酶,从而葡萄糖生成量增大。在本发明的R170A/R220A/Y227F突变体中,可以确认与亲β葡萄糖苷酶、R170A突变体、A170A/R220A突变体相比,反应28小时后的葡萄糖生成量增加。含纤维素的生物质不存在时的纤维二糖分解活性在R170A/R220A/Y227F突变体、亲β葡萄糖苷酶、R170A突变体、A170A/R220A突变体之间无差异(实施例3)。因此,确认了本发明的突变体、R170A/R220A/Y227F突变体在含纤维素的生物质存在下的活性相对于亲β葡萄糖苷酶提高。

[0132] (实施例8)170A/R220A/Y227F突变体的晶体结构分析

[0133] 为了确定A/R220A/Y227F突变体的三维结构,尝试了X射线晶体结构分析。探索新的结晶化条件,以磷酸作为沉淀剂成功地进行了结晶化。通过大型放射线实验设备SPring-8进行X射线衍射实验,在分解能2.5埃格斯特朗确定了PfuBGL的结构。结构确定使用分子置换法,模型分子使用具有序列号22所示的氨基酸序列的来源于サーモスファエラ・アグリガンズ(Themosphaera aggregans)的β-葡萄糖苷酶(ThAggBGY、PDB ID:1QVB)。将所得的3维结构数据使用结构分析用的软件CCP4\_\_Contact分析亚基之间的相互作用。将分析的结果所得的带状模型示于图4。确认了亚基A-C之间相互作用,R170A/R220A/Y227F突变体形成同型2聚体(图4)。关于分析结果所得的亚基A-C之间的相互作用,归纳于表6。

[0134] 表6

|        | 亚基 A<br>(氨基酸原子) | 亚基 B<br>(靶氨基酸原子) | 结合距离 (Å)      | 结合方式 |    |
|--------|-----------------|------------------|---------------|------|----|
| [0135] | 1               | Arg 448 (NH2)    | Glu 449 (OE1) | 2.54 | 氢键 |
|        | 2               | Leu 440 (N)      | Glu 459 (O)   | 2.97 | 氢键 |
|        | 3               | Glu 449 (OE1)    | Arg 448 (NH2) | 2.49 | 氢键 |
|        | 4               | Glu 459 (O)      | Leu440 (N)    | 2.84 | 氢键 |

[0136] 即,判明了R170A/R220A/Y227F突变体通过Arg448、Leu440、Glu449、Glu459的氨基酸残基形成氢键,从而形成2聚体。

[0137] (实施例9)突变体的制备2

[0138] 判明了本发明的突变型β葡萄糖苷酶(R170A/R220A/Y227F突变体)如实施例8所示,形成2聚体。因此,关于是否可以通过对R170A/R220A/Y227F突变体进一步导入Arg448、Glu449、Glu459的任1个以上的突变,将2聚体变为单体进行了研究。关于突变体基因的获得,使用表7所示的引物,通过以下的手法制作。

[0139] 表7

[0140]

|               |                           |       |
|---------------|---------------------------|-------|
| 突变导入位点        | 碱基序列(5'→3')               |       |
| Arg448Glu(Fw) | TTCGAGGAAATAGCCACTCAAAAAG | 序列号23 |

|               |                                |       |
|---------------|--------------------------------|-------|
| Arg448Glu(Rv) | TACCAGCGGCTTGGCCTTAAATA        | 序列号24 |
| Arg448Gly(Fw) | AAAAAGAATTTCGGTAAAATAGCCACTCA  | 序列号25 |
| Arg448Gly(Rv) | TACCAGGGCGCTTGGCGTTAAATA       | 序列号26 |
| Glu449Arg(Fw) | AGAAGGATAGCCACTCAAAAAGAAATTCCA | 序列号27 |
| Glu449Arg(Rv) | TACCAGGGCGCTTGGCCTTAAATA       | 序列号28 |
| Glu459Gly(Fw) | GGATTAGCTCACCTCGCAGACCTC       | 序列号29 |
| Glu459Gly(Rv) | AATACCAGGGCGCTTGGCCTTAAATA     | 序列号30 |

[0141] 对R170A/R220A/Y227F突变体的基因(序列号20),分别使用序列号23和24的碱基序列所示的寡核苷酸、序列号25和26的碱基序列所示的寡核苷酸、序列号27和28的碱基序列所示的寡核苷酸、序列号29和30的碱基序列所示的寡核苷酸,制作R170A/R220A/Y227F/R448E突变体(序列号31)、R170A/R220A/Y227F/R448G突变体(序列号32)、R170A/R220A/Y227F/E449R突变体(序列号33)、R170A/R220A/Y227F/E459G突变体(序列号34)基因。

[0142] 所得的各基因按照参考例1记载的顺序在大肠杆菌中实施表达。将R170A/R220A/Y227F/R448E突变体、R170A/R220A/Y227F/R448G突变体、R170A/R220A/Y227F/E449R突变体、R170A/R220A/Y227F/E459G突变体的氨基酸序列示于序列号35~38(不包含作为起始密码子的甲硫氨酸)。可以确认上述的突变体在大肠杆菌中全部可以作为异种蛋白质表达。

[0143] (实施例10)利用凝胶过滤的分子量的确定

[0144] 为了确定亲葡糖苷酶和突变体的分子量,进行利用凝胶过滤的分子量的确定。柱使用HiLood26/60Suuperde×200,缓冲液使用50mMTris-盐酸盐(pH值8)、150mM氯化钠。将实施例2、参考例1、实施例9中制备的酶添加到柱中,以缓冲液2mL/min分离。关于酶的检出,测定吸光度280nm。分子量使用卵清蛋白(44kDa)、伴清蛋白(75kDa)、醛缩酶(158kDa)、铁蛋白(440kDa)作为分子量标志物,以各个酶成分的溶出时间为基础制作标准曲线。凝胶过滤的结果,将测定的分子量(实测分子量、kDa)和由氨基酸一级结构推定的分子量(推定分子量、kDa)分别归纳于表8。

[0145] 表8

[0146]

|            | 亲β葡糖苷酶 | 突变体(R170A/R220A/Y227F) |       |       |       |       |
|------------|--------|------------------------|-------|-------|-------|-------|
|            |        | —                      | R448E | R448G | E449R | R459G |
| 实测分子量(kDa) | 237    | 129                    | 70    | 63    | 92    | 50    |
| 推定分子量(kDa) | 220    | 110                    | 55    | 55    | 55    | 55    |

[0147] 判明了亲葡糖苷酶基本显示4聚体的实测分子量(237kDa),R170A/R220A/Y227F突变体基本显示2聚体的实测分子量(129kDa)。另一方面,关于对R170A/R220A/Y227F突变体进一步导入了突变的突变体R170A/R220A/Y227F/R448E突变体、R170A/R220A/Y227F/E449R突变体、R170A/R220A/Y227F/R448G突变体、R170A/R220A/Y227F/E459G突变体,实测分子量为50kDa~90kDa的范围,推定作为进一步导入突变的效果,是完全单体化的物质。

[0148] (实施例11)突变体的纤维二糖分解活性3

[0149] 测定含纤维素的生物质存在下的亲葡糖苷酶和突变体(本发明的β葡糖苷酶)的纤维二糖分解活性。作为含纤维素的生物质,使用将稻秸用5%稀硫酸在150℃处理10分钟而



得的物质。在悬浮了含纤维素的生物质5wt%的溶液中添加10mM纤维二糖/50mM乙酸缓冲液制成反应液。在该反应液中以终浓度0.23mg/mL添加实施例9中制备的酶R170A/R220A/Y227F/R448E突变体、R170A/R220A/Y227F/E449R突变体、R170A/R220A/Y227F/R448G突变体、R170A/R220A/Y227F/E459G突变体,在50℃进行酶反应30分钟。将亲β葡糖苷酶在50℃的温度条件下生成的葡萄糖浓度(g/L)作为100%,将各突变体的纤维二糖分解活性以相对值示于表9中。

[0150] 表9

| 亲β葡糖苷酶 | 突变体 (R170A/R220A/Y227F) |       |       |       |
|--------|-------------------------|-------|-------|-------|
|        | R448E                   | R448G | E449R | R459G |
| 100%   | 179%                    | 183%  | 197%  | 197%  |

[0152] 判明了R170A/R220A/Y227F/R448E突变体、R170A/R220A/Y227F/E449R突变体、R170A/R220A/Y227F/R448G突变体、R170A/R220A/Y227F/E459G突变体相对于亲葡糖苷酶活性大幅提高。另外,判明了相对于实施例5的R170A/R220A/Y227F突变体(2聚体),实施例9的突变型葡糖苷酶(单体)活性高。

[0153] 产业可利用性

[0154] 本发明中的β葡糖苷酶在含纤维素的生物质存在下显示高的纤维二糖分解活性,因此可以在生物质的水解和糖液的制造中使用。

[0155] 本说明书中引用的所有发行物、专利和专利申请直接作为参考引入本说明书中。

- <110> 东丽株式会社  
 独立行政法人产业技术综合研究所
- <120> 突变型β 葡糖苷酶、生物质分解用酶组合物和糖液的制造方法
- <130> PH-5007-PCT
- <150> JP 2011-155792  
 <151> 2011-07-14
- <160> 38
- <170> PatentIn 版本 3.1
- <210> 1  
 <211> 472  
 <212> PRT  
 <213> 强烈炽热球菌(Pyrococcus furiosus)
- [0001] <400> 1
- Ala Lys Phe Pro Lys Asn Phe Met Phe Gly Tyr Ser Trp Ser Gly Phe  
 1                      5                      10                      15
- Gln Phe Glu Met Gly Leu Pro Gly Ser Glu Val Glu Ser Asp Trp Trp  
                     20                      25                      30
- Val Trp Val His Asp Lys Glu Asn Ile Ala Ser Gly Leu Val Ser Gly  
                     35                      40                      45
- Asp Leu Pro Glu Asn Gly Pro Ala Tyr Trp His Leu Tyr Lys Gln Asp  
                     50                      55                      60
- His Asp Ile Ala Glu Lys Leu Gly Met Asp Cys Ile Arg Gly Gly Ile  
 65                      70                      75                      80

|        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|        | Glu | Trp | Ala | Arg | Ile | Phe | Pro | Lys | Pro | Thr | Phe | Asp | Val | Lys | Val | Asp |
|        |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
|        | Val | Glu | Lys | Asp | Glu | Glu | Gly | Asn | Ile | Ile | Ser | Val | Asp | Val | Pro | Glu |
|        |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
|        | Ser | Thr | Ile | Lys | Glu | Leu | Glu | Lys | Ile | Ala | Asn | Met | Glu | Ala | Leu | Glu |
|        |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
|        | His | Tyr | Arg | Lys | Ile | Tyr | Ser | Asp | Trp | Lys | Glu | Arg | Gly | Lys | Thr | Phe |
|        |     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |
|        | Ile | Leu | Asn | Leu | Tyr | His | Trp | Pro | Leu | Pro | Leu | Trp | Ile | His | Asp | Pro |
|        | 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| [0002] | Ile | Ala | Val | Arg | Lys | Leu | Gly | Pro | Asp | Arg | Ala | Pro | Ala | Gly | Trp | Leu |
|        |     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
|        | Asp | Glu | Lys | Thr | Val | Val | Glu | Phe | Val | Lys | Phe | Ala | Ala | Phe | Val | Ala |
|        |     |     |     | 180 |     |     |     |     |     | 185 |     |     |     | 190 |     |     |
|        | Tyr | His | Leu | Asp | Asp | Leu | Val | Asp | Met | Trp | Ser | Thr | Met | Asn | Glu | Pro |
|        |     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
|        | Asn | Val | Val | Tyr | Asn | Gln | Gly | Tyr | Ile | Asn | Leu | Arg | Ser | Gly | Phe | Pro |
|        |     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
|        | Pro | Gly | Tyr | Leu | Ser | Phe | Glu | Ala | Ala | Glu | Lys | Ala | Lys | Phe | Asn | Leu |
|        | 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
|        | Ile | Gln | Ala | His | Ile | Gly | Ala | Tyr | Asp | Ala | Ile | Lys | Glu | Tyr | Ser | Glu |

|        |   |     |     |
|--------|---|-----|-----|
|        | 245   | 250 | 255 |
|        | Lys Ser Val Gly Val Ile Tyr Ala Phe Ala Trp His Asp Pro Leu Ala |     |     |
|        | 260   | 265 | 270 |
|        | Glu Glu Tyr Lys Asp Glu Val Glu Glu Ile Arg Lys Lys Asp Tyr Glu |     |     |
|        | 275   | 280 | 285 |
|        | Phe Val Thr Ile Leu His Ser Lys Gly Lys Leu Asp Trp Ile Gly Val |     |     |
|        | 290   | 295 | 300 |
|        | Asn Tyr Tyr Ser Arg Leu Val Tyr Gly Ala Lys Asp Gly His Leu Val |     |     |
|        | 305   | 310 | 315 |
| [0003] | Pro Leu Pro Gly Tyr Gly Phe Met Ser Glu Arg Gly Gly Phe Ala Lys |     |     |
|        | 325   | 330 | 335 |
|        | Ser Gly Arg Pro Ala Ser Asp Phe Gly Trp Glu Met Tyr Pro Glu Gly |     |     |
|        | 340   | 345 | 350 |
|        | Leu Glu Asn Leu Leu Lys Tyr Leu Asn Asn Ala Tyr Glu Leu Pro Met |     |     |
|        | 355   | 360 | 365 |
|        | Ile Ile Thr Glu Asn Gly Met Ala Asp Ala Ala Asp Arg Tyr Arg Pro |     |     |
|        | 370   | 375 | 380 |
|        | His Tyr Leu Val Ser His Leu Lys Ala Val Tyr Asn Ala Met Lys Glu |     |     |
|        | 385   | 390 | 395 |
|        | Gly Ala Asp Val Arg Gly Tyr Leu His Trp Ser Leu Thr Asp Asn Tyr |     |     |
|        | 405   | 410 | 415 |

Glu Trp Ala Gln Gly Phe Arg Met Arg Phe Gly Leu Val Tyr Val Asp  
 420 425 430

Phe Glu Thr Lys Lys Arg Tyr Leu Arg Pro Ser Ala Leu Val Phe Arg  
 435 440 445

Glu Ile Ala Thr Gln Lys Glu Ile Pro Glu Glu Leu Ala His Leu Ala  
 450 455 460

Asp Leu Lys Phe Val Thr Arg Lys  
 465 470

<210> 2

<211> 1416

<212> DNA

<213> 强烈炽热球菌(Pyrococcus furiosus)

[0004]

<400> 2

gcaaagtcc caaaaaactt catgtttgga tattcttggc ctggtttcca gttgagatg 60

ggactgccag gaagtgaagt ggaaagcgac tgggtgggtgt gggttcacga caaggagaac 120

atagcatcag gtctagtaag tggagatcta ccagagaacg gcccagcata ttggcacctc 180

tataagcaag atcatgacat tgcagaaaag ctaggaatgg attgtattag aggtggcatt 240

gagtgggcaa gaatttttcc aaagccaaca tttgacgta aagttgatgt ggaaaaggat 300

gaagaaggca acataatttc cgtagacggt ccagagagta caataaaaga gctagagaaa 360

attgccaaca tggaggccct tgaacattat cgcaagattt actcagactg gaaggagagg 420

ggcaaaacct tcatattaaa cctctaccac tggectette cattatggat tcatgacca 480

attgcagtaa ggaaacttgg cccggatagg gctcctgcag gatggttaga tgagaagaca 540

gtggtagagt ttgtgaagtt tgccgccttc gttgcttacc accttgatga cctcgttgac 600

|        |  |      |
|--------|--|------|
|        | atgtggagca caatgaacga accaaacgta gtctacaatc aaggttacat taatctacgt  | 660  |
|        | tcaggatttc caccaggata tctaagcttt gaagcagcag aaaaggcaaa attcaactta  | 720  |
|        | attcaggctc acatcggagc atatgatgcc ataaaagagt attcagaaaa atccgtggga  | 780  |
|        | gtgatatacg cctttgcttg gcacgatcct ctagecggagg agtataagga tgaagtagag | 840  |
|        | gaaatcagaa agaaagacta tgagtttgta acaattctac actcaaaagg aaagctagac  | 900  |
|        | tggatcggcg taaactacta ctccaggctg gtatatggag ccaaagatgg acacctagtt  | 960  |
|        | cctttacctg gatatggatt tatgagtggag agaggaggat ttgcaaagtc aggaagacct | 1020 |
|        | gctagtgact ttggatggga aatgtacca gagggccttg agaaccttct taagtattta   | 1080 |
|        | aacaatgect acgagctacc aatgataatt acagagaacg gtatggccga tgcagcagat  | 1140 |
|        | agatacagge cacactatct cgtaagccat ctaaaggcag tttacaatgc tatgaaagaa  | 1200 |
| [0005] | ggtgctgatg ttagagggta tctccactgg tctetaacag acaactaega atgggcccga  | 1260 |
|        | gggttcagga tgagatttgg attggtttac gtggatttcg agacaaagaa gagatattta  | 1320 |
|        | aggccaageg ccttggattt cagagaaata gccactcaaa aagaaattcc agaagaatta  | 1380 |
|        | gctcaccteg cagacctcaa atttgttaca agaaag                            | 1416 |
|        | <210> 3  |      |
|        | <211> 40   |      |
|        | <212> DNA  |      |
|        | <213> 人工序列   |      |
|        | <220>  |      |
|        | <223> 引物   |      |
|        | <400> 3  |      |
|        | caattgcagt aaggaaactt ggccccgatg cgctcctgc                         | 40   |

|        |  |    |
|--------|--|----|
|        | <210> 4                                      |    |
|        | <211> 40                                     |    |
|        | <212> DNA                                    |    |
|        | <213> 人工序列                                   |    |
|        | <220>  |    |
|        | <223> 引物                                     |    |
|        | <400> 4                                      |    |
|        | gcaggagccg catccgggccc aagtttcctt actgcaattg | 40 |
|        | <210> 5                                      |    |
|        | <211> 35                                     |    |
|        | <212> DNA                                    |    |
|        | <213> 人工序列                                   |    |
|        | <220>  |    |
|        | <223> 引物                                     |    |
| [0006] | <400> 5                                      |    |
|        | ggttacatta atctagcttc aggatttcca ccagg       | 35 |
|        | <210> 6                                      |    |
|        | <211> 35                                     |    |
|        | <212> DNA                                    |    |
|        | <213> 人工序列                                   |    |
|        | <220>  |    |
|        | <223> 引物                                     |    |
|        | <400> 6                                      |    |
|        | cctggtggaa atcctgaagc tagattaatg taacc       | 35 |
|        | <210> 7                                      |    |
|        | <211> 32                                     |    |
|        | <212> DNA                                    |    |
|        | <213> 人工序列                                   |    |
|        | <220>  |    |

<223> 引物

<400> 7

ggatttccac caggatttct aagctttgaa gc

32

<210> 8

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 8

gcttcaaagc ttagaaatcc tgggtgaaat cc

32

<210> 9

<211> 472

<212> PRT

[0007]

<213> 强烈炽热球菌(Pyrococcus furiosus) R170A

<400> 9

Ala Lys Phe Pro Lys Asn Phe Met Phe Gly Tyr Ser Trp Ser Gly Phe  
1                    5                    10                    15

Gln Phe Glu Met Gly Leu Pro Gly Ser Glu Val Glu Ser Asp Trp Trp  
                  20                    25                    30

Val Trp Val His Asp Lys Glu Asn Ile Ala Ser Gly Leu Val Ser Gly  
                  35                    40                    45

Asp Leu Pro Glu Asn Gly Pro Ala Tyr Trp His Leu Tyr Lys Gln Asp  
                  50                    55                    60

His Asp Ile Ala Glu Lys Leu Gly Met Asp Cys Ile Arg Gly Gly Ile



|        |   |     |     |     |     |     |     |
|--------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|        | 65  |     | 70  |     | 75  |     | 80  |
|        | Glu Trp Ala Arg Ile Phe Pro Lys Pro Thr Phe Asp Val Lys Val Asp |     |     |     |     |     |     |
|        |   | 85  |     | 90  |     | 95  |     |
|        | Val Glu Lys Asp Glu Glu Gly Asn Ile Ile Ser Val Asp Val Pro Glu |     |     |     |     |     |     |
|        |   | 100 |     | 105 |     | 110 |     |
|        | Ser Thr Ile Lys Glu Leu Glu Lys Ile Ala Asn Met Glu Ala Leu Glu |     |     |     |     |     |     |
|        |   | 115 |     | 120 |     | 125 |     |
|        | His Tyr Arg Lys Ile Tyr Ser Asp Trp Lys Glu Arg Gly Lys Thr Phe |     |     |     |     |     |     |
|        |   | 130 |     | 135 |     | 140 |     |
| [0008] | Ile Leu Asn Leu Tyr His Trp Pro Leu Pro Leu Trp Ile His Asp Pro |     |     |     |     |     |     |
|        | 145   |     | 150 |     | 155 |     | 160 |
|        | Ile Ala Val Arg Lys Leu Gly Pro Asp Ala Ala Pro Ala Gly Trp Leu |     |     |     |     |     |     |
|        |   | 165 |     | 170 |     | 175 |     |
|        | Asp Glu Lys Thr Val Val Glu Phe Val Lys Phe Ala Ala Phe Val Ala |     |     |     |     |     |     |
|        |   | 180 |     | 185 |     | 190 |     |
|        | Tyr His Leu Asp Asp Leu Val Asp Met Trp Ser Thr Met Asn Glu Pro |     |     |     |     |     |     |
|        |   | 195 |     | 200 |     | 205 |     |
|        | Asn Val Val Tyr Asn Gln Gly Tyr Ile Asn Leu Arg Ser Gly Phe Pro |     |     |     |     |     |     |
|        |   | 210 |     | 215 |     | 220 |     |
|        | Pro Gly Tyr Leu Ser Phe Glu Ala Ala Glu Lys Ala Lys Phe Asn Leu |     |     |     |     |     |     |
|        |   | 225 |     | 230 |     | 235 | 240 |

Ile Gln Ala His Ile Gly Ala Tyr Asp Ala Ile Lys Glu Tyr Ser Glu  
245 250 255

Lys Ser Val Gly Val Ile Tyr Ala Phe Ala Trp His Asp Pro Leu Ala  
260 265 270

Glu Glu Tyr Lys Asp Glu Val Glu Glu Ile Arg Lys Lys Asp Tyr Glu  
275 280 285

Phe Val Thr Ile Leu His Ser Lys Gly Lys Leu Asp Trp Ile Gly Val  
290 295 300

Asn Tyr Tyr Ser Arg Leu Val Tyr Gly Ala Lys Asp Gly His Leu Val  
305 310 315 320

[0009] Pro Leu Pro Gly Tyr Gly Phe Met Ser Glu Arg Gly Gly Phe Ala Lys  
325 330 335

Ser Gly Arg Pro Ala Ser Asp Phe Gly Trp Glu Met Tyr Pro Glu Gly  
340 345 350

Leu Glu Asn Leu Leu Lys Tyr Leu Asn Asn Ala Tyr Glu Leu Pro Met  
355 360 365

Ile Ile Thr Glu Asn Gly Met Ala Asp Ala Ala Asp Arg Tyr Arg Pro  
370 375 380

His Tyr Leu Val Ser His Leu Lys Ala Val Tyr Asn Ala Met Lys Glu  
385 390 395 400

Gly Ala Asp Val Arg Gly Tyr Leu His Trp Ser Leu Thr Asp Asn Tyr

405

410

415

Glu Trp Ala Gln Gly Phe Arg Met Arg Phe Gly Leu Val Tyr Val Asp  
 420 425 430

Phe Glu Thr Lys Lys Arg Tyr Leu Arg Pro Ser Ala Leu Val Phe Arg  
 435 440 445

Glu Ile Ala Thr Gln Lys Glu Ile Pro Glu Glu Leu Ala His Leu Ala  
 450 455 460

Asp Leu Lys Phe Val Thr Arg Lys  
 465 470

[0010]

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 472

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 强烈炽热球菌(Pyrococcus furiosus) R220A

&lt;400&gt; 10

Ala Lys Phe Pro Lys Asn Phe Met Phe Gly Tyr Ser Trp Ser Gly Phe  
 1 5 10 15

Gln Phe Glu Met Gly Leu Pro Gly Ser Glu Val Glu Ser Asp Trp Trp  
 20 25 30

Val Trp Val His Asp Lys Glu Asn Ile Ala Ser Gly Leu Val Ser Gly  
 35 40 45

Asp Leu Pro Glu Asn Gly Pro Ala Tyr Trp His Leu Tyr Lys Gln Asp  
 50 55 60

|        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
|        | His | Asp | Ile | Ala | Glu | Lys | Leu | Gly | Met | Asp | Cys | Ile | Arg | Gly | Gly | Ile |  |
|        | 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |  |
|        | Glu | Trp | Ala | Arg | Ile | Phe | Pro | Lys | Pro | Thr | Phe | Asp | Val | Lys | Val | Asp |  |
|        |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     |     | 95  |  |
|        | Val | Glu | Lys | Asp | Glu | Glu | Gly | Asn | Ile | Ile | Ser | Val | Asp | Val | Pro | Glu |  |
|        |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     |     | 110 |     |  |
|        | Ser | Thr | Ile | Lys | Glu | Leu | Glu | Lys | Ile | Ala | Asn | Met | Glu | Ala | Leu | Glu |  |
|        |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |  |
|        | His | Tyr | Arg | Lys | Ile | Tyr | Ser | Asp | Trp | Lys | Glu | Arg | Gly | Lys | Thr | Phe |  |
|        |     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |  |
| [0011] | Ile | Leu | Asn | Leu | Tyr | His | Trp | Pro | Leu | Pro | Leu | Trp | Ile | His | Asp | Pro |  |
|        | 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     |     | 155 |     |     |     | 160 |  |
|        | Ile | Ala | Val | Arg | Lys | Leu | Gly | Pro | Asp | Arg | Ala | Pro | Ala | Gly | Trp | Leu |  |
|        |     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     |     | 175 |  |
|        | Asp | Glu | Lys | Thr | Val | Val | Glu | Phe | Val | Lys | Phe | Ala | Ala | Phe | Val | Ala |  |
|        |     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     |     | 190 |     |  |
|        | Tyr | His | Leu | Asp | Asp | Leu | Val | Asp | Met | Trp | Ser | Thr | Met | Asn | Glu | Pro |  |
|        |     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     |     | 205 |     |     |  |
|        | Asn | Val | Val | Tyr | Asn | Gln | Gly | Tyr | Ile | Asn | Leu | Ala | Ser | Gly | Phe | Pro |  |
|        |     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     |     | 220 |     |     |     |  |
|        | Pro | Gly | Tyr | Leu | Ser | Phe | Glu | Ala | Ala | Glu | Lys | Ala | Lys | Phe | Asn | Leu |  |
|        | 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |

Ile Gln Ala His Ile Gly Ala Tyr Asp Ala Ile Lys Glu Tyr Ser Glu  
 245 250 255

Lys Ser Val Gly Val Ile Tyr Ala Phe Ala Trp His Asp Pro Leu Ala  
 260 265 270

Glu Glu Tyr Lys Asp Glu Val Glu Glu Ile Arg Lys Lys Asp Tyr Glu  
 275 280 285

Phe Val Thr Ile Leu His Ser Lys Gly Lys Leu Asp Trp Ile Gly Val  
 290 295 300

Asn Tyr Tyr Ser Arg Leu Val Tyr Gly Ala Lys Asp Gly His Leu Val  
 305 310 315 320

[0012]

Pro Leu Pro Gly Tyr Gly Phe Met Ser Glu Arg Gly Gly Phe Ala Lys  
 325 330 335

Ser Gly Arg Pro Ala Ser Asp Phe Gly Trp Glu Met Tyr Pro Glu Gly  
 340 345 350

Leu Glu Asn Leu Leu Lys Tyr Leu Asn Asn Ala Tyr Glu Leu Pro Met  
 355 360 365

Ile Ile Thr Glu Asn Gly Met Ala Asp Ala Ala Asp Arg Tyr Arg Pro  
 370 375 380

His Tyr Leu Val Ser His Leu Lys Ala Val Tyr Asn Ala Met Lys Glu  
 385 390 395 400

Gly Ala Asp Val Arg Gly Tyr Leu His Trp Ser Leu Thr Asp Asn Tyr  
 405 410 415

Glu Trp Ala Gln Gly Phe Arg Met Arg Phe Gly Leu Val Tyr Val Asp  
 420 425 430

Phe Glu Thr Lys Lys Arg Tyr Leu Arg Pro Ser Ala Leu Val Phe Arg  
 435 440 445

Glu Ile Ala Thr Gln Lys Glu Ile Pro Glu Glu Leu Ala His Leu Ala  
 450 455 460

Asp Leu Lys Phe Val Thr Arg Lys  
 465 470

- [0013] <210> 11  
 <211> 472  
 <212> PRT  
 <213> 强烈炽热球菌(Pyrococcus furiosus) Y227F  
 <400> 11

Ala Lys Phe Pro Lys Asn Phe Met Phe Gly Tyr Ser Trp Ser Gly Phe  
 1 5 10 15

Gln Phe Glu Met Gly Leu Pro Gly Ser Glu Val Glu Ser Asp Trp Trp  
 20 25 30

Val Trp Val His Asp Lys Glu Asn Ile Ala Ser Gly Leu Val Ser Gly  
 35 40 45

Asp Leu Pro Glu Asn Gly Pro Ala Tyr Trp His Leu Tyr Lys Gln Asp  
 50 55 60



|        |   |   |     |     |     |  |     |
|--------|---|---|-----|-----|-----|--|-----|
|        | 225   |   | 230 |     | 235 |  | 240 |
|        | Ile Gln Ala His   | Ile Gly Ala Tyr Asp Ala Ile Lys Glu Tyr Ser Glu | 245 | 250 | 255 |  |     |
|        | Lys Ser Val Gly Val Ile Tyr Ala Phe Ala Trp His Asp Pro Leu Ala | 260   | 265 | 270 |     |  |     |
|        | Glu Glu Tyr Lys Asp Glu Val Glu Glu Ile Arg Lys Lys Asp Tyr Glu | 275   | 280 | 285 |     |  |     |
|        | Phe Val Thr Ile Leu His Ser Lys Gly Lys Leu Asp Trp Ile Gly Val | 290   | 295 | 300 |     |  |     |
| [0015] | Asn Tyr Tyr Ser Arg Leu Val Tyr Gly Ala Lys Asp Gly His Leu Val | 305   | 310 | 315 | 320 |  |     |
|        | Pro Leu Pro Gly Tyr Gly Phe Met Ser Glu Arg Gly Gly Phe Ala Lys | 325   | 330 | 335 |     |  |     |
|        | Ser Gly Arg Pro Ala Ser Asp Phe Gly Trp Glu Met Tyr Pro Glu Gly | 340   | 345 | 350 |     |  |     |
|        | Leu Glu Asn Leu Leu Lys Tyr Leu Asn Asn Ala Tyr Glu Leu Pro Met | 355   | 360 | 365 |     |  |     |
|        | Ile Ile Thr Glu Asn Gly Met Ala Asp Ala Ala Asp Arg Tyr Arg Pro | 370   | 375 | 380 |     |  |     |
|        | His Tyr Leu Val Ser His Leu Lys Ala Val Tyr Asn Ala Met Lys Glu | 385   | 390 | 395 | 400 |  |     |



Gly Ala Asp Val Arg Gly Tyr Leu His Trp Ser Leu Thr Asp Asn Tyr  
 405 410 415

Glu Trp Ala Gln Gly Phe Arg Met Arg Phe Gly Leu Val Tyr Val Asp  
 420 425 430

Phe Glu Thr Lys Lys Arg Tyr Leu Arg Pro Ser Ala Leu Val Phe Arg  
 435 440 445

Glu Ile Ala Thr Gln Lys Glu Ile Pro Glu Glu Leu Ala His Leu Ala  
 450 455 460

Asp Leu Lys Phe Val Thr Arg Lys  
 465 470

- [0016] <210> 12  
 <211> 472  
 <212> PRT  
 <213> 强烈炽热球菌(Pyrococcus furiosus) R170A/Y227F  
 <400> 12

Ala Lys Phe Pro Lys Asn Phe Met Phe Gly Tyr Ser Trp Ser Gly Phe  
 1 5 10 15

Gln Phe Glu Met Gly Leu Pro Gly Ser Glu Val Glu Ser Asp Trp Trp  
 20 25 30

Val Trp Val His Asp Lys Glu Asn Ile Ala Ser Gly Leu Val Ser Gly  
 35 40 45

Asp Leu Pro Glu Asn Gly Pro Ala Tyr Trp His Leu Tyr Lys Gln Asp  
 50 55 60

His Asp Ile Ala Glu Lys Leu Gly Met Asp Cys Ile Arg Gly Gly Ile  
65 70 75 80

Glu Trp Ala Arg Ile Phe Pro Lys Pro Thr Phe Asp Val Lys Val Asp  
85 90 95

Val Glu Lys Asp Glu Glu Gly Asn Ile Ile Ser Val Asp Val Pro Glu  
100 105 110

Ser Thr Ile Lys Glu Leu Glu Lys Ile Ala Asn Met Glu Ala Leu Glu  
115 120 125

His Tyr Arg Lys Ile Tyr Ser Asp Trp Lys Glu Arg Gly Lys Thr Phe  
130 135 140

[0017]

Ile Leu Asn Leu Tyr His Trp Pro Leu Pro Leu Trp Ile His Asp Pro  
145 150 155 160

Ile Ala Val Arg Lys Leu Gly Pro Asp Ala Ala Pro Ala Gly Trp Leu  
165 170 175

Asp Glu Lys Thr Val Val Glu Phe Val Lys Phe Ala Ala Phe Val Ala  
180 185 190

Tyr His Leu Asp Asp Leu Val Asp Met Trp Ser Thr Met Asn Glu Pro  
195 200 205

Asn Val Val Tyr Asn Gln Gly Tyr Ile Asn Leu Arg Ser Gly Phe Pro  
210 215 220

Pro Gly Phe Leu Ser Phe Glu Ala Ala Glu Lys Ala Lys Phe Asn Leu  
 225 230 235 240

Ile Gln Ala His Ile Gly Ala Tyr Asp Ala Ile Lys Glu Tyr Ser Glu  
 245 250 255

Lys Ser Val Gly Val Ile Tyr Ala Phe Ala Trp His Asp Pro Leu Ala  
 260 265 270

Glu Glu Tyr Lys Asp Glu Val Glu Glu Ile Arg Lys Lys Asp Tyr Glu  
 275 280 285

Phe Val Thr Ile Leu His Ser Lys Gly Lys Leu Asp Trp Ile Gly Val  
 290 295 300

[0018] Asn Tyr Tyr Ser Arg Leu Val Tyr Gly Ala Lys Asp Gly His Leu Val  
 305 310 315 320

Pro Leu Pro Gly Tyr Gly Phe Met Ser Glu Arg Gly Gly Phe Ala Lys  
 325 330 335

Ser Gly Arg Pro Ala Ser Asp Phe Gly Trp Glu Met Tyr Pro Glu Gly  
 340 345 350

Leu Glu Asn Leu Leu Lys Tyr Leu Asn Asn Ala Tyr Glu Leu Pro Met  
 355 360 365

Ile Ile Thr Glu Asn Gly Met Ala Asp Ala Ala Asp Arg Tyr Arg Pro  
 370 375 380

His Tyr Leu Val Ser His Leu Lys Ala Val Tyr Asn Ala Met Lys Glu  
 385 390 395 400

Gly Ala Asp Val Arg Gly Tyr Leu His Trp Ser Leu Thr Asp Asn Tyr  
 405 410 415

Glu Trp Ala Gln Gly Phe Arg Met Arg Phe Gly Leu Val Tyr Val Asp  
 420 425 430

Phe Glu Thr Lys Lys Arg Tyr Leu Arg Pro Ser Ala Leu Val Phe Arg  
 435 440 445

Glu Ile Ala Thr Gln Lys Glu Ile Pro Glu Glu Leu Ala His Leu Ala  
 450 455 460

Asp Leu Lys Phe Val Thr Arg Lys  
 465 470

[0019]

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 472

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 强烈炽热球菌(Pyrococcus furiosus) R170A/R220A

&lt;400&gt; 13

Ala Lys Phe Pro Lys Asn Phe Met Phe Gly Tyr Ser Trp Ser Gly Phe  
 1 5 10 15

Gln Phe Glu Met Gly Leu Pro Gly Ser Glu Val Glu Ser Asp Trp Trp  
 20 25 30

Val Trp Val His Asp Lys Glu Asn Ile Ala Ser Gly Leu Val Ser Gly  
 35 40 45

Asp Leu Pro Glu Asn Gly Pro Ala Tyr Trp His Leu Tyr Lys Gln Asp



Pro Gly Tyr Leu Ser Phe Glu Ala Ala Glu Lys Ala Lys Phe Asn Leu  
225 230 235 240

Ile Gln Ala His Ile Gly Ala Tyr Asp Ala Ile Lys Glu Tyr Ser Glu  
245 250 255

Lys Ser Val Gly Val Ile Tyr Ala Phe Ala Trp His Asp Pro Leu Ala  
260 265 270

Glu Glu Tyr Lys Asp Glu Val Glu Glu Ile Arg Lys Lys Asp Tyr Glu  
275 280 285

Phe Val Thr Ile Leu His Ser Lys Gly Lys Leu Asp Trp Ile Gly Val  
290 295 300

[0021] Asn Tyr Tyr Ser Arg Leu Val Tyr Gly Ala Lys Asp Gly His Leu Val  
305 310 315 320

Pro Leu Pro Gly Tyr Gly Phe Met Ser Glu Arg Gly Gly Phe Ala Lys  
325 330 335

Ser Gly Arg Pro Ala Ser Asp Phe Gly Trp Glu Met Tyr Pro Glu Gly  
340 345 350

Leu Glu Asn Leu Leu Lys Tyr Leu Asn Asn Ala Tyr Glu Leu Pro Met  
355 360 365

Ile Ile Thr Glu Asn Gly Met Ala Asp Ala Ala Asp Arg Tyr Arg Pro  
370 375 380

His Tyr Leu Val Ser His Leu Lys Ala Val Tyr Asn Ala Met Lys Glu

|   |   |     |     |
|---|---|-----|-----|
| 385   | 390   | 395 | 400 |
| Gly Ala Asp Val Arg Gly Tyr Leu His Trp Ser Leu Thr Asp Asn Tyr | 405   | 410 | 415 |
| Glu Trp Ala Gln Gly Phe Arg Met Arg Phe Gly Leu Val Tyr Val Asp | 420   | 425 | 430 |
| Phe Glu Thr Lys Lys Arg Tyr Leu Arg Pro Ser Ala Leu Val Phe Arg | 435   | 440 | 445 |
| Glu Ile Ala Thr Gln Lys Glu Ile Pro Glu Glu Leu Ala His Leu Ala | 450   | 455 | 460 |
| [0022] Asp Leu Lys Phe Val Thr Arg Lys                          | 465   | 470 |     |
| <210>   | 14  |     |     |
| <211>   | 472   |     |     |
| <212>   | PRT   |     |     |
| <213>   | 强烈炽热球菌(Pyrococcus furiosus) R170A/R220A/Y227F |     |     |
| <400>   | 14  |     |     |
| Ala Lys Phe Pro Lys Asn Phe Met Phe Gly Tyr Ser Trp Ser Gly Phe | 1   | 5   | 10  |
| Gln Phe Glu Met Gly Leu Pro Gly Ser Glu Val Glu Ser Asp Trp Trp | 20  | 25  | 30  |
| Val Trp Val His Asp Lys Glu Asn Ile Ala Ser Gly Leu Val Ser Gly | 35  | 40  | 45  |

Asp Leu Pro Glu Asn Gly Pro Ala Tyr Trp His Leu Tyr Lys Gln Asp  
 50 55 60

His Asp Ile Ala Glu Lys Leu Gly Met Asp Cys Ile Arg Gly Gly Ile  
 65 70 75 80

Glu Trp Ala Arg Ile Phe Pro Lys Pro Thr Phe Asp Val Lys Val Asp  
 85 90 95

Val Glu Lys Asp Glu Glu Gly Asn Ile Ile Ser Val Asp Val Pro Glu  
 100 105 110

Ser Thr Ile Lys Glu Leu Glu Lys Ile Ala Asn Met Glu Ala Leu Glu  
 115 120 125

[0023] His Tyr Arg Lys Ile Tyr Ser Asp Trp Lys Glu Arg Gly Lys Thr Phe  
 130 135 140

Ile Leu Asn Leu Tyr His Trp Pro Leu Pro Leu Trp Ile His Asp Pro  
 145 150 155 160

Ile Ala Val Arg Lys Leu Gly Pro Asp Ala Ala Pro Ala Gly Trp Leu  
 165 170 175

Asp Glu Lys Thr Val Val Glu Phe Val Lys Phe Ala Ala Phe Val Ala  
 180 185 190

Tyr His Leu Asp Asp Leu Val Asp Met Trp Ser Thr Met Asn Glu Pro  
 195 200 205

Asn Val Val Tyr Asn Gln Gly Tyr Ile Asn Leu Ala Ser Gly Phe Pro  
 210 215 220



Pro Gly Phe Leu Ser Phe Glu Ala Ala Glu Lys Ala Lys Phe Asn Leu  
 225 230 235 240

Ile Gln Ala His Ile Gly Ala Tyr Asp Ala Ile Lys Glu Tyr Ser Glu  
 245 250 255

Lys Ser Val Gly Val Ile Tyr Ala Phe Ala Trp His Asp Pro Leu Ala  
 260 265 270

Glu Glu Tyr Lys Asp Glu Val Glu Glu Ile Arg Lys Lys Asp Tyr Glu  
 275 280 285

Phe Val Thr Ile Leu His Ser Lys Gly Lys Leu Asp Trp Ile Gly Val  
 290 295 300

[0024]

Asn Tyr Tyr Ser Arg Leu Val Tyr Gly Ala Lys Asp Gly His Leu Val  
 305 310 315 320

Pro Leu Pro Gly Tyr Gly Phe Met Ser Glu Arg Gly Gly Phe Ala Lys  
 325 330 335

Ser Gly Arg Pro Ala Ser Asp Phe Gly Trp Glu Met Tyr Pro Glu Gly  
 340 345 350

Leu Glu Asn Leu Leu Lys Tyr Leu Asn Asn Ala Tyr Glu Leu Pro Met  
 355 360 365

Ile Ile Thr Glu Asn Gly Met Ala Asp Ala Ala Asp Arg Tyr Arg Pro  
 370 375 380

His Tyr Leu Val Ser His Leu Lys Ala Val Tyr Asn Ala Met Lys Glu  
385 390 395 400

Gly Ala Asp Val Arg Gly Tyr Leu His Trp Ser Leu Thr Asp Asn Tyr  
405 410 415

Glu Trp Ala Gln Gly Phe Arg Met Arg Phe Gly Leu Val Tyr Val Asp  
420 425 430

Phe Glu Thr Lys Lys Arg Tyr Leu Arg Pro Ser Ala Leu Val Phe Arg  
435 440 445

Glu Ile Ala Thr Gln Lys Glu Ile Pro Glu Glu Leu Ala His Leu Ala  
450 455 460

[0025] Asp Leu Lys Phe Val Thr Arg Lys  
465 470

<210> 15

<211> 472

<212> PRT

<213> 强烈炽热球菌(Pyrococcus furiosus) R170A/R220A/Y227F(带有糖基化位点)

<400> 15

Ala Lys Phe Pro Lys Asn Phe Met Phe Gly Tyr Ser Trp Ser Gly Phe  
1 5 10 15

Gln Phe Glu Met Gly Leu Pro Gly Ser Glu Val Glu Ser Asp Trp Trp  
20 25 30

Val Trp Val His Asp Lys Glu Asn Ile Ala Ser Gly Leu Val Ser Gly  
35 40 45

Asp Leu Pro Glu Asn Gly Pro Ala Tyr Trp Asn Arg Thr Lys Gln Asp  
 50 55 60

His Asp Ile Ala Glu Lys Leu Gly Met Asp Cys Ile Arg Gly Gly Ile  
 65 70 75 80

Glu Trp Ala Arg Ile Phe Pro Lys Pro Thr Phe Asp Val Lys Val Asp  
 85 90 95

Val Glu Lys Asp Glu Glu Gly Asn Ile Ile Ser Val Asp Val Pro Glu  
 100 105 110

Ser Thr Ile Lys Glu Leu Glu Lys Ile Ala Asn Met Glu Ala Leu Glu  
 115 120 125

[0026] His Tyr Arg Lys Ile Tyr Ser Asp Trp Lys Glu Arg Gly Lys Thr Phe  
 130 135 140

Ile Leu Asn Leu Tyr His Trp Pro Leu Pro Leu Trp Ile His Asp Pro  
 145 150 155 160

Ile Ala Val Arg Lys Leu Gly Pro Asp Ala Ala Pro Ala Gly Trp Leu  
 165 170 175

Asp Glu Lys Thr Val Val Glu Phe Val Lys Phe Ala Ala Phe Val Ala  
 180 185 190

Tyr His Leu Asp Asp Leu Val Asp Met Trp Ser Thr Met Asn Glu Pro  
 195 200 205

Asn Val Val Tyr Asn Gln Gly Tyr Ile Asn Leu Ala Ser Gly Phe Pro



His Tyr Leu Val Ser His Leu Lys Ala Val Tyr Asn Ala Met Lys Glu  
385 390 395 400

Gly Ala Asp Val Arg Gly Tyr Leu His Trp Ser Leu Thr Asp Asn Tyr  
405 410 415

Glu Trp Ala Gln Gly Phe Arg Met Arg Phe Gly Leu Val Tyr Val Asp  
420 425 430

Phe Glu Thr Lys Lys Arg Tyr Leu Arg Pro Ser Ala Leu Val Phe Arg  
435 440 445

Glu Ile Ala Thr Gln Lys Glu Ile Pro Glu Glu Leu Ala His Leu Ala  
450 455 460

[0028] Asp Leu Lys Phe Val Thr Arg Lys  
465 470

<210> 16

<211> 1380

<212> DNA

<213> 强烈炽热球菌(Pyrococcus furiosus) R170A

<400> 16

gcaaagtcc caaaaaactt catgtttgga tattcttggc ctggtttcca gtttgagatg 60

ggactgccag gaagtgaagt ggaaagcgac tgggtgggtgt gggttcacga caaggagaac 120

atagcatcag gtctagtaag tggagatcta ccagagaacg gccagcata ttggcacctc 180

tataagcaag atcatgacat tgcagaaaag ctaggaatgg attgtattag aggtggcatt 240

gagtgggcaa gaatttttcc aaagccaaca tttgacgta aagttgatgt ggaaaaggat 300

gaagaaggca acataatttc cgtagacgtt ccagagagta caataaaaga gctagagaaa 360

|        |   |      |
|--------|---|------|
|        | attgccaaca tggaggccct tgaacattat cgcaagattt actcagactg gaaggagagg | 420  |
|        | ggcaaaacct tcatattaaa cctctaccac tggectette cattatggat tcatgacca  | 480  |
|        | attgcagtaa ggaaacttgg cccggatgeg gctcctgcag gatggttaga tgagaagaca | 540  |
|        | gtggtagagt ttgtgaagtt tgccgccttc gttgcttate accttgatga cctcgttgac | 600  |
|        | atgtggagca caatgaacga accaaacgta gtctacaate aaggttacat taatctacgt | 660  |
|        | tcaggatttc caccaggata tctaagcttt gaagcagcag aaaaggcaaa attcaactta | 720  |
|        | attcaggctc acatcggagc atatgatgcc ataaaagagt attcagaaaa atccgtggga | 780  |
|        | gtgatatacg cctttgcttg geacgatcct ctagcggagg agtataagga tgaagtagag | 840  |
|        | gaaatcagaa agaaagacta tgagtttgta acaattctac actcaaaagg aaagctagac | 900  |
|        | tggatcggcg taaactacta ctcagcctg gtatatggag ccaaagatgg acacctagtt  | 960  |
| [0029] | cctttacctg gatatggatt tatgagtgag agaggaggat ttgcaaagtc aggaagacct | 1020 |
|        | gctagtgaet ttggatggga aatgtacca gagggccttg agaaccttct taagtattta  | 1080 |
|        | aacaatgcct acgagctacc aatgataatt acagagaacg gtatggccga tgcagcagat | 1140 |
|        | agatacagge cacactatct cgtaagccat ctaaagcag tttacaatgc tatgaaagaa  | 1200 |
|        | ggtgctgatg ttagagggta tctcactgg tctctaacag acaactacga atgggcccac  | 1260 |
|        | gggttcagga tgagatttgg attggtttac gtggatttcg agacaaagaa gagatattta | 1320 |
|        | aggccaagcg ccttggattt cagagaaata gccactcaaa aagaaattcc agaagaatta | 1380 |
|        | <210> 17  |      |
|        | <211> 1416  |      |
|        | <212> DNA   |      |
|        | <213> 强烈炽热球菌(Pyrococcus furiosus) R220A                           |      |
|        | <400> 17  |      |

|        |   |      |
|--------|---|------|
|        | gcaaagtcc caaaaaactt catgtttgga tattcttggc ctggtttcca gtttgagatg  | 60   |
|        | ggactgccag gaagtgaagt ggaaagcgac tggtaggtgt gggttcacga caaggagaac | 120  |
|        | atagcatcag gtctagtaag tggagatcta ccagagaacg gcccagcata ttggcacctc | 180  |
|        | tataagcaag atcatgacat tgcagaaaag ctaggaatgg attgtattag agtggcatt  | 240  |
|        | gagtgggcaa gaatttttcc aaagccaaca tttgacgta aagttgatgt ggaaaaggat  | 300  |
|        | gaagaaggca acataatttc cgtagacggt ccagagagta caataaaaga gctagagaaa | 360  |
|        | attgccaaca tggaggccct tgaacattat cgcaagattt actcagactg gaaggagagg | 420  |
|        | ggcaaaacct tcatattaac cctctaccac tggectcttc cattatggat teatgacca  | 480  |
|        | attgcagtaa ggaaacttgg cccggatagg gctcctgcag gatggttaga tgagaagaca | 540  |
|        | gtggtagagt ttgtgaagtt tgccgcttc gttgcttacc accttgatga cctcgttgac  | 600  |
| [0030] | atgtggagca caatgaacga accaaacgta gtctacaatc aaggttacat taatctagct | 660  |
|        | tcaggatttc caccaggata tetaagcttt gaagcagcag aaaaggcaaa attcaactta | 720  |
|        | attcaggctc acateggagc atatgatgcc ataaaagagt attcagaaaa atccgtggga | 780  |
|        | gtgatatacg cctttgcttg gcacgatcct ctageggagg agtataagga tgaagtagag | 840  |
|        | gaaatcagaa agaaagacta tgagtttgta acaattctac actcaaaagg aaagctagac | 900  |
|        | tggatcggeg faaactacta ctccaggctg gtatatggag ccaaagatgg acacctagtt | 960  |
|        | cctttacctg gatattgatt tatgagttag agaggaggat ttgcaaagtc aggaagacct | 1020 |
|        | gctagtgact ttggatggga aatgtacca gagggccttg agaaccttct taagtattta  | 1080 |
|        | aacaatgcct acgagctacc aatgataatt acagagaacg gtatggccga tgcagcagat | 1140 |
|        | agatacagge cacactatct cgtaagccat ctaaaggcag tttacaatgc tatgaaagaa | 1200 |
|        | ggtgctgat ttagaggta tetccaactg tetetaacag acaactacga atgggccccaa  | 1260 |

|        |  |      |
|--------|--|------|
|        | gggttcagga tgagatttgg attggtttac gtggatttcg agacaaagaa gagatattta  | 1320 |
|        | aggccaageg ccttggattt cagagaaata gccactcaaa aagaaattcc agaagaatta  | 1380 |
|        | gctcactcag cagacctcaa atttgttaca agaaag                            | 1416 |
|        | <210> 18   |      |
|        | <211> 1416   |      |
|        | <212> DNA  |      |
|        | <213> 强烈炽热球菌(Pyrococcus furiosus) Y227F                            |      |
|        | <400> 18   |      |
|        | gcaaagttcc caaaaaactt catgtttgga tattcttggc ctggtttcca gtttgagatg  | 60   |
|        | ggactgccag gaagtgaagt ggaaagcgac tggtaggtgt gggttcacga caaggagaac  | 120  |
|        | atagcatcag gtctagtaag tggagatcta ccagagaacg gccacagata ttggcacctc  | 180  |
|        | tataagcaag atcatgacat tgcagaaaag ctaggaatgg attgtattag aggtggcatt  | 240  |
| [0031] | gagtgggcaa gaatttttcc aaagccaaca tttgacgta aagttgatgt ggaaaaggat   | 300  |
|        | gaagaaggca acataatttc cgtagacgtt ccagagagta caataaaaga gctagagaaa  | 360  |
|        | attgccaaca tggaggccct tgaacattat cgcaagattt actcagactg gaaggagagg  | 420  |
|        | ggcaaaacct tcatattaaa cctctaccac tggcctcttc cattatggat tcatgacceca | 480  |
|        | attgcagtaa ggaaacttgg cccgatagg gctcctgcag gatggttaga tgagaagaca   | 540  |
|        | gtggtagagt ttgtgaagtt tgcgccttc gttgcttate accttgatga cctcgttgac   | 600  |
|        | atgtggagca caatgaacga accaaaagta gtctacaate aagttacat taatctacgt   | 660  |
|        | tcaggatttc caccaggatt tctaagcttt gaagcagcag aaaaggcaaa attcaactta  | 720  |
|        | attcaggctc acatcggage atatgatgcc ataaaagagt attcagaaaa atccgtggga  | 780  |
|        | gtgatatacg cctttgettg gcacgatctc ctagcggagg agtataagga tgaagtagag  | 840  |
|        | gaaatcagaa agaaagaeta tgagtttgta acaattctac actcaaaagg aaagctagac  | 900  |



tggatcggcg taaactacta ctccaggctg gtatatggag ccaaagatgg acacctagtt 960  
 cctttacctg gatatggatt tatgagttag agaggaggat ttgcaaagtc aggaagacct 1020  
 gctagtgact ttggatggga aatgtaccca gagggccttg agaaccttct taagtattta 1080  
 aacaatgcct acgagctacc aatgataatt acagagaacg gtatggccga tgcagcagat 1140  
 agatacagge cacactatct cgtaagccat ctaaaggcag tttacaatgc tatgaaagaa 1200  
 ggtgctgatg ttagagggta tctccactgg tctctaacag acaactacga atgggcccga 1260  
 gggttcagga tgagatttgg attggtttac gtggatttcc agacaaagaa gagatattta 1320  
 aggccaagcg ccttggattt cagagaaata gccactcaa aagaaattcc agaagaatta 1380  
 gctcacctcg cagacctcaa atttgttaca agaaag 1416

[0032]

<210> 19  
 <211> 1416  
 <212> DNA  
 <213> 强烈炽热球菌(Pyrococcus furiosus) R170A/Y227F

<400> 19  
 gcaaagttcc caaaaaactt catgtttgga tattcttggc ctggtttcca gttgagatg 60  
 ggactgccag gaagtgaagt ggaaagcgac tggtaggtgt gggttcacga caaggagaac 120  
 atagcatcag gtctagtaag tggagatcta ccagagaacg gccagcata ttggcacctc 180  
 tataagcaag atcatgacat tgcagaaaag ctaggaatgg attgtattag agtggcatt 240  
 gaggggcaa gaatttttcc aaagccaaca tttgacgta aagttgatgt gaaaaaggat 300  
 gaagaaggca acataatttc cgtagacggt ccagagagta caataaaga gctagagaaa 360  
 attgccaaca tggagccct tgaacattat cgcaagattt actcagactg gaaggagagg 420  
 ggcaaacct tcatattaaa cctctaccac tggcctette cattatgat tcatgacca 480

|        |  |      |
|--------|--|------|
|        | attgcagtaa ggaaacttgg cccggatgcg gctcctgcag gatggttaga tgagaagaca  | 540  |
|        | gtggtagagt ttgtgaagtt tgecgcttc gttgcttacc accttgatga cctcgttgac   | 600  |
|        | atgtggagca caatgaacga accaaacgta gtctacaatc aaggttacat taatctacgt  | 660  |
|        | tcaggatttc caccaggatt tctaagcttt gaagcagcag aaaaggeaaa attcaactta  | 720  |
|        | attcaggctc acatcggagc atatgatgcc ataaaagagt attcagaaaa atccgtggga  | 780  |
|        | gtgatatacg cctttgcttg gcacgatcct ctagcggagg agtataagga tgaagtagag  | 840  |
|        | gaaatcagaa agaaagacta tgagtttgta acaattctac actcaaaagg aaagctagac  | 900  |
|        | tggatcggcg taaactacta ctccagctg gtatatggag ccaaagatgg acacctagtt   | 960  |
|        | cctttacctg gatatggatt tatgagttag agaggaggat ttgcaaagtc aggaagacct  | 1020 |
|        | gctagtgact ttggatggga aatgtacce gagggccttg agaaccttct taagtattta   | 1080 |
| [0033] | aacaatgect acgagctacc aatgataatt acagagaacg gtatggccga tgcagcagat  | 1140 |
|        | agatacaggc cacactatct cgtaagccat ctaaaggcag tttaacaatgc tatgaaagaa | 1200 |
|        | gggtctgatg tttagaggta tetccactgg tetctaacag acaactacga atgggcccga  | 1260 |
|        | gggttcagga tgagatttgg attggtttac gtggatttcg agacaaagaa gagatattta  | 1320 |
|        | aggccaagcg ccctggtatt cagagaaata gccactcaaa aagaaattcc agaagaatta  | 1380 |
|        | gctcacctcg cagacctcaa atttgttaca agaaag                            | 1416 |
|        | <210> 20   |      |
|        | <211> 1416   |      |
|        | <212> DNA  |      |
|        | <213> 强烈炽热球菌(Pyrococcus furiosus) R170A/R220A/Y227F                |      |
|        | <400> 20   |      |
|        | gcaaagtcc caaaaaactt catgtttgga tattcttggc ctggtttcca gtttgagatg   | 60   |
|        | ggactgccag gaagtgaagt ggaaagcagc tgggtgggtg gggttcacga caaggagaac  | 120  |

|        |  |      |
|--------|--|------|
|        | atagcatcag gtctagtaag tggagateta ccagagaacg gcccagcata ttggcacctc  | 180  |
|        | tataagcaag atcatgacat tgcagaaaag ctaggaatgg attgtattag aggtggcatt  | 240  |
|        | gagtgggcaa gaatTTTTCC aaagccaaca tttgacgta aagttgatgt ggaaaaggat   | 300  |
|        | gaagaaggca acataatttc cgtagacgtt ccagagagta caataaaaga gctagagaaa  | 360  |
|        | attgccaaaca tggaggccct tgaacattat cgcaagattt actcagactg gaaggagagg | 420  |
|        | ggcaaaacct tcatattaaa cctctaccac tggcctcttc cattatggat tcatgacca   | 480  |
|        | attgcagtaa ggaaacttgg cccggatgeg getcctgcag gatggttaga tgagaagaca  | 540  |
|        | gtggtagagt ttgtgaagtt tgccgecttc gttgcttate accttgatga cctcgttgac  | 600  |
|        | atgtggagca caatgaacga accaaacgta gtctacaate aaggttacat taatctagct  | 660  |
|        | tcaggatttc caccaggatt tetaagcttt gaagcagcag aaaaggcaaa attcaactta  | 720  |
| [0034] | attcaggctc acatcggagc atatgatgcc ataaaagagt attcagaaaa atccgtggga  | 780  |
|        | gtgatatacg cctttgcttg gcacgatcct ctageggagg agtataagga tgaagtagag  | 840  |
|        | gaaatcagaa agaaagacta tgagtttgta acaattctac actcaaaagg aaagctagac  | 900  |
|        | tggatcggcg taaactacta ctccaggctg gtatatggag ccaaagatgg acacctagtt  | 960  |
|        | cctttacctg gatatggatt tatgagtgag agaggaggat ttgcaaagtc aggaagacct  | 1020 |
|        | gctagtgact ttggatggga aatgtacca gagggccttg agaaccttet taagtattta   | 1080 |
|        | aacaatgctt acgagctacc aatgataatt acagagaacg gtatggccga tgcagcagat  | 1140 |
|        | agatacagge cacactatct cgtaagccat ctaaaggcag ttfacaatge tatgaaagaa  | 1200 |
|        | ggtgctgatg ttagagggtat tctccactgg tctctaacag acaactacga atgggcccaa | 1260 |
|        | gggttcagga tgagatttgg attggtttac gtggatttcg agacaaagaa gagatattta  | 1320 |
|        | aggccaageg ccctggtatt cagagaaata gccactcaaa aagaaattcc agaagaatta  | 1380 |

|        |   |      |
|--------|---|------|
|        | gctcacctcg cagacctcaa atttgttaca agaaag                           | 1416 |
|        | <210> 21  |      |
|        | <211> 1416  |      |
|        | <212> DNA   |      |
|        | <213> 强烈炽热球菌(Pyrococcus furiosus) R170A/R220A                     |      |
|        | <400> 21  |      |
|        | gcaaagtcc caaaaaactt catgtttgga tattcttggc ctggtttcca gttgagatg   | 60   |
|        | ggactgccag gaagtgaagt ggaaagcgac tggtaggtgt gggttcacga caaggagaac | 120  |
|        | atagcatcag gtetagtaag tggagatcta ccagagaacg gccagcata ttggcacctc  | 180  |
|        | tataagcaag atcatgacat tgcagaaaag ctaggaatgg attgtattag aggtggcatt | 240  |
|        | gagtgggcaa gaatttttcc aaagccaaca tttgacgta aagttgatgt ggaaaaggat  | 300  |
| [0035] | gaagaaggca acataatttc cgtagacggt ccagagagta caataaaaga gctagagaaa | 360  |
|        | attgccaaca tggaggecct tgaacattat cgcaagattt actcagactg gaaggagagg | 420  |
|        | ggcaaaaect tcatattaaa cctctaccac tggcctcttc cattatggat tcatgaccca | 480  |
|        | attgcagtaa ggaaacttgg cccggatgcg gtcctgcag gatggttaga tgagaagaca  | 540  |
|        | gtggtagagt ttgtgaagtt tgccgccttc gttgettate accttgatga cctcgttgac | 600  |
|        | atgtggagca caatgaacga accaaacgta gtctacaate aaggttacat taatctagct | 660  |
|        | tcaggatttc caccaggata tctaagcttt gaagcagcag aaaaggcaaa attcaactta | 720  |
|        | attcaggctc acateggagc atatgatgcc ataaaagagt attcagaaaa atccgtggga | 780  |
|        | gtgatatacg cctttgettg gcacgatcct ctageggagg agtataagga tgaagtagag | 840  |
|        | gaaatcagaa agaaagacta tgagtttgta acaattctac actcaaaagg aaagctagac | 900  |
|        | tggatcggcg taaactacta ctccaggctg gtatatggag ccaaagatgg acacctagtt | 960  |

cctttacctg gatatggatt tatgagtgag agaggaggat ttgcaaagtc aggaagacct 1020  
 gctagtgaact ttggatggga aatgtaccca gagggccttg agaaccttct taagtattta 1080  
 aacaatgect acgagctacc aatgataatt acagagaacg gtatggccga tgcagcagat 1140  
 agatacagge cacactatct cgtaagccat ctaaaggcag tttacaatgc tatgaaagaa 1200  
 ggtgctgatg ttagagggta tetccactgg tetctaacag acaactacga atgggcccaa 1260  
 gggttcagga tgagatttgg attggtttac gtggatttcg agacaaagaa gagatattta 1320  
 aggecaageg ccttggattt cagagaaata gccactcaaa aagaaattcc agaagaatta 1380  
 gctcacctcg cagacctcaa atttgttaca agaaag 1416

<210> 22

<211> 481

<212> PRT

<213> Thermosphaera aggregans

[0036]

<400> 22

Met Lys Phe Pro Lys Asp Phe Met Ile Gly Tyr Ser Ser Ser Pro Phe  
 1 5 10 15

Gln Phe Glu Ala Gly Ile Pro Gly Ser Glu Asp Pro Asn Ser Asp Trp  
 20 25 30

Trp Val Trp Val His Asp Pro Glu Asn Thr Ala Ala Gly Leu Val Ser  
 35 40 45

Gly Asp Phe Pro Glu Asn Gly Pro Gly Tyr Trp Asn Leu Asn Gln Asn  
 50 55 60

Asp His Asp Leu Ala Glu Lys Leu Gly Val Asn Thr Ile Arg Val Gly  
 65 70 75 80

Val Glu Trp Ser Arg Ile Phe Pro Lys Pro Thr Phe Asn Val Lys Val  
85 90 95

Pro Val Glu Arg Asp Glu Asn Gly Ser Ile Val His Val Asp Val Asp  
100 105 110

Asp Lys Ala Val Glu Arg Leu Asp Glu Leu Ala Asn Lys Glu Ala Val  
115 120 125

Asn His Tyr Val Glu Met Tyr Lys Asp Trp Val Glu Arg Gly Arg Lys  
130 135 140

Leu Ile Leu Asn Leu Tyr His Trp Pro Leu Pro Leu Trp Leu His Asn  
145 150 155 160

[0037]

Pro Ile Met Val Arg Arg Met Gly Pro Asp Arg Ala Pro Ser Gly Trp  
165 170 175

Leu Asn Glu Glu Ser Val Val Glu Phe Ala Lys Tyr Ala Ala Tyr Ile  
180 185 190

Ala Trp Lys Met Gly Glu Leu Pro Val Met Trp Ser Thr Met Asn Glu  
195 200 205

Pro Asn Val Val Tyr Glu Gln Gly Tyr Met Phe Val Lys Gly Gly Phe  
210 215 220

Pro Pro Gly Tyr Leu Ser Leu Glu Ala Ala Asp Lys Ala Arg Arg Asn  
225 230 235 240

Met Ile Gln Ala His Ala Arg Ala Tyr Asp Asn Ile Lys Arg Phe Ser  
 245 250 255

Lys Lys Pro Val Gly Leu Ile Tyr Ala Phe Gln Trp Phe Glu Leu Leu  
 260 265 270

Glu Gly Pro Ala Glu Val Phe Asp Lys Phe Lys Ser Ser Lys Leu Tyr  
 275 280 285

Tyr Phe Thr Asp Ile Val Ser Lys Gly Ser Ser Ile Ile Asn Val Glu  
 290 295 300

Tyr Arg Arg Asp Leu Ala Asn Arg Leu Asp Trp Leu Gly Val Asn Tyr  
 305 310 315 320

[0038] Tyr Ser Arg Leu Val Tyr Lys Ile Val Asp Asp Lys Pro Ile Ile Leu  
 325 330 335

His Gly Tyr Gly Phe Leu Cys Thr Pro Gly Gly Ile Ser Pro Ala Glu  
 340 345 350

Asn Pro Cys Ser Asp Phe Gly Trp Glu Val Tyr Pro Glu Gly Leu Tyr  
 355 360 365

Leu Leu Leu Lys Glu Leu Tyr Asn Arg Tyr Gly Val Asp Leu Ile Val  
 370 375 380

Thr Glu Asn Gly Val Ser Asp Ser Arg Asp Ala Leu Arg Pro Ala Tyr  
 385 390 395 400

Leu Val Ser His Val Tyr Ser Val Trp Lys Ala Ala Asn Glu Gly Ile  
 405 410 415

Pro Val Lys Gly Tyr Leu His Trp Ser Leu Thr Asp Asn Tyr Glu Trp  
 420 425 430

Ala Gln Gly Phe Arg Gln Lys Phe Gly Leu Val Met Val Asp Phe Lys  
 435 440 445

Thr Lys Lys Arg Tyr Leu Arg Pro Ser Ala Leu Val Phe Arg Glu Ile  
 450 455 460

Ala Thr His Asn Gly Ile Pro Asp Glu Leu Gln His Leu Thr Leu Ile  
 465 470 475 480

Gln

[0039]

<210> 23

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 23

ttcgaggaaa tagcactca aaaag

25

<210> 24

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物



|        |                                   |  |    |
|--------|-----------------------------------|--|----|
|        | <400> 24                          |  |    |
|        | taccagggcg cttggcetta aata        |  | 24 |
|        | <210> 25                          |  |    |
|        | <211> 27                          |  |    |
|        | <212> DNA                         |  |    |
|        | <213> 人工序列                        |  |    |
|        | <220>                             |  |    |
|        | <223> 引物                          |  |    |
|        | <400> 25                          |  |    |
|        | ttcggtgaaa tagccactca aaaagaa     |  | 27 |
|        | <210> 26                          |  |    |
|        | <211> 24                          |  |    |
|        | <212> DNA                         |  |    |
|        | <213> 人工序列                        |  |    |
| [0040] | <220>                             |  |    |
|        | <223> 引物                          |  |    |
|        | <400> 26                          |  |    |
|        | taccagggcg cttggcetta aata        |  | 24 |
|        | <210> 27                          |  |    |
|        | <211> 30                          |  |    |
|        | <212> DNA                         |  |    |
|        | <213> 人工序列                        |  |    |
|        | <220>                             |  |    |
|        | <223> 引物                          |  |    |
|        | <400> 27                          |  |    |
|        | agaaggatag ccaactcaaaa agaaattcca |  | 30 |
|        | <210> 28                          |  |    |
|        | <211> 24                          |  |    |

|        |   |    |
|--------|---|----|
|        | <212> DNA   |    |
|        | <213> 人工序列  |    |
|        | <220>   |    |
|        | <223> 引物  |    |
|        | <400> 28  |    |
|        | taccagggcg cttggcctta aata  | 24 |
|        | <210> 29  |    |
|        | <211> 24  |    |
|        | <212> DNA   |    |
|        | <213> 人工序列  |    |
|        | <220>   |    |
|        | <223> 引物  |    |
|        | <400> 29  |    |
|        | ggattagetc acctcgcaga cetc  | 24 |
| [0041] |   |    |
|        | <210> 30  |    |
|        | <211> 26  |    |
|        | <212> DNA   |    |
|        | <213> 人工序列  |    |
|        | <220>   |    |
|        | <223> 引物  |    |
|        | <400> 30  |    |
|        | aataccaggg cgcttggcct taaata                                      | 26 |
|        | <210> 31  |    |
|        | <211> 1416  |    |
|        | <212> DNA   |    |
|        | <213> 强烈炽热球菌(Pyrococcus furiosus) R170A/R220A/Y227F/R448E         |    |
|        | <400> 31  |    |
|        | gcaaagttec caaaaaactt catgtttgga tattcttggc ctggtttcca gtttgagatg | 60 |

|        |   |      |
|--------|---|------|
|        | ggactgccag gaagtgaagt ggaaagcgac tggtgggtgt gggttcacga caaggagaac | 120  |
|        | atagcatcag gtctagtaag tggagatcta ccagagaacg gccagacata ttggcacctc | 180  |
|        | tataagcaag atcatgacat tgcagaaaag ctaggaatgg attgtattag aggtggcatt | 240  |
|        | gagtgggcaa gaatttttcc aaagccaaca tttgacgta aagttgatgt ggaaaaggat  | 300  |
|        | gaagaaggca acataatttc cgtagacgtt ccagagagta caataaaaga gctagagaaa | 360  |
|        | attgccaaca tggaggecct tgaacattat cgcaagattt actcagactg gaaggagagg | 420  |
|        | ggcaaacct tcatattaaa cetetaccac tggectette cattatggat tcatgacca   | 480  |
|        | attgcagtaa ggaaacttgg cccggatgcg gctcctgcag gatggttaga tgagaagaca | 540  |
|        | gtggtagagt ttgtgaagtt tgecccttc gttgcttate accttgatga cctcgttgac  | 600  |
|        | atgtggagca caatgaacga accaaacgta gtctacaatc aaggttacat taatctagct | 660  |
| [0042] | tcaggatttc caccaggatt tetaagcttt gaagcagcag aaaaggcaaa attcaactta | 720  |
|        | attcaggctc acatcggage atatgatgcc ataaaagagt attcagaaaa atccgtggga | 780  |
|        | gtgatatacg cctttgcttg gcaecatcct ctagcggagg agtataagga tgaagtagag | 840  |
|        | gaaatcagaa agaaagacta tgagtttgta acaattctac actcaaaagg aaagctagac | 900  |
|        | tggatcggcg taaactacta ctccaggctg gtatatggag ccaaagatgg acacctagtt | 960  |
|        | cctttacctg gatatggatt tatgagtgag agaggaggat ttgcaaagtc aggaagacct | 1020 |
|        | gctagtgaet ttggatggga aatgtacca gagggecttg agaaccttct taagtattta  | 1080 |
|        | aacaatgect acgagctace aatgataatt acagagaacg gtatggccga tgcagcagat | 1140 |
|        | agatacagge cacactatct cgtaagccat ctaaaggcag tttaaatgc tatgaaagaa  | 1200 |
|        | ggtgctgatg ttagagggta tetccactgg tctctaacag acaactacga atgggcccac | 1260 |
|        | gggttcagga tgagatttgg attggittac gtggattteg agacaaagaa gagatattta | 1320 |

|        |  |      |
|--------|--|------|
|        | aggccaagcg ccctggtatt cgaggaaata gccactcaaa aagaaattcc agaagaatta  | 1380 |
|        | gctcacctcg cagacctcaa atttggtaca agaaag                            | 1416 |
|        | <210> 32   |      |
|        | <211> 1416   |      |
|        | <212> DNA  |      |
|        | <213> 强烈炽热球菌(Pyrococcus furiosus) R170/R220A/Y227F/R448G           |      |
|        | <400> 32   |      |
|        | gcaaagttcc caaaaaactt catgtttgga tattcttggc ctggtttcca gtttgagatg  | 60   |
|        | ggactgccag gaagtgaagt ggaaagcgac tgggtgggtg gggttcacga caaggagaac  | 120  |
|        | atagcatcag gtctagtaag tggagatcta ccagagaacg gccagcata ttggcacctc   | 180  |
|        | tataagcaag atcatgacat tgcagaaaag ctaggaatgg attgtattag aggtggcatt  | 240  |
|        | gagtgggcaa gaatitttcc aaagccaaca ttigacgta aagttgatgt ggaaaaggat   | 300  |
| [0043] | gaagaaggca acataattc cgtagacgtt ccagagagta caataaaga gctagagaaa    | 360  |
|        | attgccaaca tggaggecct tgaacattat cgcaagattt actcagactg gaaggagagg  | 420  |
|        | ggcaaaacct tcatattaaa cctctaccac tggcctctc cattatggat tcatgacca    | 480  |
|        | attgcagtaa ggaaacttgg cccggatgcg gctcctgcag gatggttaga tgagaagaca  | 540  |
|        | gtggtagagt ttgtgaagtt tgccgcttc gttgcttacc accttgatga cctcgttgac   | 600  |
|        | atgtggagca caatgaacga accaaacgta gtetacaatc aaggttacat taatetagct  | 660  |
|        | tcaggatttc caccaggatt tctaagcttt gaagcagcag aaaaggcaaa attcaactta  | 720  |
|        | attcaggetc acatcggagc atatgatgcc ataaaagagt attcagaaaa atccgtggga  | 780  |
|        | gtgatatacg cctttgcttg gcacgatcct ctagecggagg agtataagga tgaagtagag | 840  |
|        | gaaatcagaa agaaagacta tgagtttgta acaattctac actcaaaagg aaagctagac  | 900  |
|        | tggatcggcg taaactaeta ctccaggetg gtatatggag ccaaagatgg acacctagtt  | 960  |

cctttacctg gatatggatt tatgagtgag agaggaggat ttgcaaagtc aggaagacct 1020  
 gctagtgact ttggatggga aatgtacca gagggccttg agaaccctct taagtattta 1080  
 aacaatgcct acgagctacc aatgataatt acagagaacg gtatggccga tgcagcagat 1140  
 agatacagge cacactatct cgtaagccat ctaaaggcag tttacaatgc tatgaaagaa 1200  
 ggtgctgatg ttagagggta tctccactgg tctctaacag acaactacga atgggcccga 1260  
 gggttcagga tgagatttgg attggtttac gtggatttcg agacaaagaa gagatattta 1320  
 aggccaagcg cctggtatt cggtgaaata gccactcaaa aagaaattcc agaagaatta 1380  
 gctcacctcg cagacctcaa atttgttaca agaaag 1416

<210> 33

<211> 1416

<212> DNA

[0044]

<213> 强烈炽热球菌(Pyrococcus furiosus) R170/R220A/Y227F/E449R

<400> 33

gcaaagtcc caaaaaactt catgtttgga tattcttggc ctggtttcca gttgagatg 60  
 ggactgccag gaagtgaagt ggaaagcgac tggtaggtgt gggttcacga caaggagaac 120  
 atagcatcag gtctagtaag tggagatcta ccagagaacg gccagcata ttggcacctc 180  
 tataagcaag atcatgacat tgcagaaaag ctaggaatgg attgtattag aggtggcatt 240  
 gagtgggcaa gaattttcc aaagccaaca tttgacgta aagttgatgt ggaaaaggat 300  
 gaagaaggca acataatttc cgtagacggt ccagagagta caataaaaga gctagagaaa 360  
 attgccaaca tggaggcctt tgaacattat cgcaagattt actcagactg gaaggagagg 420  
 ggcaaaacct tcataataaa cctctaccac tggectcttc cattatggat tcatgacca 480  
 attgcagtaa ggaaacttgg cccggatgcg gctcctgcag gatggttaga tgagaagaca 540

|        |   |      |
|--------|---|------|
|        | gtggtagagt ttgtgaagtt tgccgccttc gttgcttate accttgatga cctcgttgac | 600  |
|        | atgtggagea caatgaacga accaaacgta gtctacaatc aaggttacat taatctaget | 660  |
|        | tcaggatttc caccaggatt tctaagcttt gaagcagcag aaaaggcaaa attcaactta | 720  |
|        | attcaggctc acatcggage atatgatgce ataaaagagt attcagaaaa atccgtggga | 780  |
|        | gtgatatacg cctttgcttg gcacgatcct ctagcggagg agtataagga tgaagtagag | 840  |
|        | gaaatcagaa agaaagacta tgagtttgta acaattctac actcaaaagg aaagctagac | 900  |
|        | tggatcggcg taaactacta ctccagctg gtatatggag ccaaagatgg acacctagtt  | 960  |
|        | cctttacctg gatatggatt tatgagtgag agaggaggat ttgcaaagtc aggaagacct | 1020 |
|        | getagtgact ttggatggga aatgtaceca gagggccttg agaaccttet taagtattta | 1080 |
|        | aacaatgcct acgagctacc aatgataatt acagagaacg gtatggccga tgcagcagat | 1140 |
| [0045] | agatacaggc cacactatct cgtaagccat ctaaaggcag tttacaatgc tatgaaagaa | 1200 |
|        | ggtgetgatg ttagagggta tetceactgg tetctaacag acaactacga atgggcecaa | 1260 |
|        | gggttcagga tgagatttgg attggtttac gtggatttcg agacaaagaa gagatattta | 1320 |
|        | aggccaagcg ccttggattt cagaaggata gccactcaaa aagaaattec agaagaatta | 1380 |
|        | gctcacctcg cagacctcaa atttgttaca agaaag                           | 1416 |
|        | <210> 34  |      |
|        | <211> 1416  |      |
|        | <212> DNA   |      |
|        | <213> 强烈炽热球菌(Pyrococcus furiosus) R170/R220A/Y227F/E459G          |      |
|        | <400> 34  |      |
|        | gcaaagtcc caaaaaactt catgtttga tattcttggc ctggtttcca gtttgagatg   | 60   |
|        | ggactgccag gaagtgaagt ggaaagcgac tgggtgggtg gggttcacga caaggagaac | 120  |
|        | atagcatcag gtctagtaag tggagateta ccagagaacg gccacgcata ttgacacctc | 180  |

|        |  |      |
|--------|--|------|
|        | tataagcaag atcatgacat tgcagaaaag ctaggaatgg attgtattag aggtggcatt  | 240  |
|        | gagtgggcaa gaatitttcc aaagccaaca ttgacgta aagttgatgt ggaaaaggat    | 300  |
|        | gaagaaggca acataatttc cgtagacggt ccagagagta caataaaaga gctagagaaa  | 360  |
|        | attgccaaca tggaggcect tgaacattat cgcaagattt actcagactg gaaggagagg  | 420  |
|        | ggcaaaacct tcatattaaa cctetaccac tggectette cattatggat tcatgacca   | 480  |
|        | attgcagtaa ggaaacttgg cccggatgcg gctcctgcag gatggttaga tgagaagaca  | 540  |
|        | gtggtagagt ttgtgaagtt tgccgccttc gttgcttacc accttgatga cctegttgac  | 600  |
|        | atgtggagca caatgaacga accaaaacgta gtctacaatc aaggttacat taatctagct | 660  |
|        | tcaggatttc caccaggatt tetaagcttt gaagcagcag aaaaggcaaa attcaactta  | 720  |
|        | attcaggctc acatcggagc atatgatgcc ataaaagagt attcagaaaa atccgtggga  | 780  |
| [0046] | gtgatatacg cctttgcttg gcacgatcct ctacggagg agtataagga tgaagtagag   | 840  |
|        | gaaatcagaa agaaagacta tgagtttgta acaattctac actcaaaagg aaagctagac  | 900  |
|        | tggatcggcg taaactacta ctccagctg gtatatggag ccaaagatgg acacctagtt   | 960  |
|        | cctttacctg gatattgatt tatgagtgag agaggaggat ttgcaaagtc aggaagacct  | 1020 |
|        | gctagtgact ttggatggga aatgtacca gagggccttg agaaccttct taagtattta   | 1080 |
|        | aacaatgect acgagctacc aatgataatt acagagaacg gtatggccga tgcagcagat  | 1140 |
|        | agatacaggc cacactatct cgtaagccat ctaaaggcag tttacaatgc tatgaaagaa  | 1200 |
|        | ggtgctgatg ttagagggta tetccactgg tetctaacag acaactacga atgggcccga  | 1260 |
|        | gggttcagga tgagatttgg attggtttac gtggatttcg agacaaagaa gagatattta  | 1320 |
|        | aggccaagcg ccttggtatt cagagaaata gccactcaa aagaaattcc agaaggatta   | 1380 |
|        | gctcacctcg cagacctcaa attgttaca agaaag                             | 1416 |

<210> 35  
 <211> 472  
 <212> PRT  
 <213> 强烈炽热球菌(Pyrococcus furiosus) R170A/R220A/Y227F/R448E

<400> 35

Ala Lys Phe Pro Lys Asn Phe Met Phe Gly Tyr Ser Trp Ser Gly Phe  
 1                    5                    10                    15

Gln Phe Glu Met Gly Leu Pro Gly Ser Glu Val Glu Ser Asp Trp Trp  
                   20                    25                    30

Val Trp Val His Asp Lys Glu Asn Ile Ala Ser Gly Leu Val Ser Gly  
                   35                    40                    45

[0047] Asp Leu Pro Glu Asn Gly Pro Ala Tyr Trp His Leu Tyr Lys Gln Asp  
                   50                    55                    60

His Asp Ile Ala Glu Lys Leu Gly Met Asp Cys Ile Arg Gly Gly Ile  
 65                    70                    75                    80

Glu Trp Ala Arg Ile Phe Pro Lys Pro Thr Phe Asp Val Lys Val Asp  
                   85                    90                    95

Val Glu Lys Asp Glu Glu Gly Asn Ile Ile Ser Val Asp Val Pro Glu  
                   100                    105                    110

Ser Thr Ile Lys Glu Leu Glu Lys Ile Ala Asn Met Glu Ala Leu Glu  
                   115                    120                    125

His Tyr Arg Lys Ile Tyr Ser Asp Trp Lys Glu Arg Gly Lys Thr Phe



|        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
|        | 130 |     | 135 |     | 140 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|        | Ile | Leu | Asn | Leu | Tyr | His | Trp | Pro | Leu | Pro | Leu | Trp | Ile | His | Asp | Pro |  |
|        | 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     | 160 |     |  |
|        | Ile | Ala | Val | Arg | Lys | Leu | Gly | Pro | Asp | Ala | Ala | Pro | Ala | Gly | Trp | Leu |  |
|        |     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |
|        | Asp | Glu | Lys | Thr | Val | Val | Glu | Phe | Val | Lys | Phe | Ala | Ala | Phe | Val | Ala |  |
|        |     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |
|        | Tyr | His | Leu | Asp | Asp | Leu | Val | Asp | Met | Trp | Ser | Thr | Met | Asn | Glu | Pro |  |
|        |     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     |     | 205 |     |     |  |
| [0048] | Asn | Val | Val | Tyr | Asn | Gln | Gly | Tyr | Ile | Asn | Leu | Ala | Ser | Gly | Phe | Pro |  |
|        | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |
|        | Pro | Gly | Phe | Leu | Ser | Phe | Glu | Ala | Ala | Glu | Lys | Ala | Lys | Phe | Asn | Leu |  |
|        | 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |
|        | Ile | Gln | Ala | His | Ile | Gly | Ala | Tyr | Asp | Ala | Ile | Lys | Glu | Tyr | Ser | Glu |  |
|        |     |     |     | 245 |     |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |
|        | Lys | Ser | Val | Gly | Val | Ile | Tyr | Ala | Phe | Ala | Trp | His | Asp | Pro | Leu | Ala |  |
|        |     |     | 260 |     |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |  |
|        | Glu | Glu | Tyr | Lys | Asp | Glu | Val | Glu | Glu | Ile | Arg | Lys | Lys | Asp | Tyr | Glu |  |
|        |     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     |     | 285 |     |     |  |
|        | Phe | Val | Thr | Ile | Leu | His | Ser | Lys | Gly | Lys | Leu | Asp | Trp | Ile | Gly | Val |  |
|        | 290 |     |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |  |

Asn Tyr Tyr Ser Arg Leu Val Tyr Gly Ala Lys Asp Gly His Leu Val  
 305 310 315 320

Pro Leu Pro Gly Tyr Gly Phe Met Ser Glu Arg Gly Gly Phe Ala Lys  
 325 330 335

Ser Gly Arg Pro Ala Ser Asp Phe Gly Trp Glu Met Tyr Pro Glu Gly  
 340 345 350

Leu Glu Asn Leu Leu Lys Tyr Leu Asn Asn Ala Tyr Glu Leu Pro Met  
 355 360 365

Ile Ile Thr Glu Asn Gly Met Ala Asp Ala Ala Asp Arg Tyr Arg Pro  
 370 375 380

[0049] His Tyr Leu Val Ser His Leu Lys Ala Val Tyr Asn Ala Met Lys Glu  
 385 390 395 400

Gly Ala Asp Val Arg Gly Tyr Leu His Trp Ser Leu Thr Asp Asn Tyr  
 405 410 415

Glu Trp Ala Gln Gly Phe Arg Met Arg Phe Gly Leu Val Tyr Val Asp  
 420 425 430

Phe Glu Thr Lys Lys Arg Tyr Leu Arg Pro Ser Ala Leu Val Phe Glu  
 435 440 445

Glu Ile Ala Thr Gln Lys Glu Ile Pro Glu Glu Leu Ala His Leu Ala  
 450 455 460

Asp Leu Lys Phe Val Thr Arg Lys

465

470

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 472

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 强烈炽热球菌(Pyrococcus furiosus) R170A/R220A/Y227F/R448G

&lt;400&gt; 36

Ala Lys Phe Pro Lys Asn Phe Met Phe Gly Tyr Ser Trp Ser Gly Phe  
1                    5                    10                    15

Gln Phe Glu Met Gly Leu Pro Gly Ser Glu Val Glu Ser Asp Trp Trp  
                  20                    25                    30

Val Trp Val His Asp Lys Glu Asn Ile Ala Ser Gly Leu Val Ser Gly  
                  35                    40                    45

[0050]

Asp Leu Pro Glu Asn Gly Pro Ala Tyr Trp His Leu Tyr Lys Gln Asp  
50                    55                    60

His Asp Ile Ala Glu Lys Leu Gly Met Asp Cys Ile Arg Gly Gly Ile  
65                    70                    75                    80

Glu Trp Ala Arg Ile Phe Pro Lys Pro Thr Phe Asp Val Lys Val Asp  
                  85                    90                    95

Val Glu Lys Asp Glu Glu Gly Asn Ile Ile Ser Val Asp Val Pro Glu  
                  100                    105                    110

Ser Thr Ile Lys Glu Leu Glu Lys Ile Ala Asn Met Glu Ala Leu Glu  
                  115                    120                    125

His Tyr Arg Lys Ile Tyr Ser Asp Trp Lys Glu Arg Gly Lys Thr Phe  
 130 135 140

Ile Leu Asn Leu Tyr His Trp Pro Leu Pro Leu Trp Ile His Asp Pro  
 145 150 155 160

Ile Ala Val Arg Lys Leu Gly Pro Asp Ala Ala Pro Ala Gly Trp Leu  
 165 170 175

Asp Glu Lys Thr Val Val Glu Phe Val Lys Phe Ala Ala Phe Val Ala  
 180 185 190

Tyr His Leu Asp Asp Leu Val Asp Met Trp Ser Thr Met Asn Glu Pro  
 195 200 205

[0051] Asn Val Val Tyr Asn Gln Gly Tyr Ile Asn Leu Ala Ser Gly Phe Pro  
 210 215 220

Pro Gly Phe Leu Ser Phe Glu Ala Ala Glu Lys Ala Lys Phe Asn Leu  
 225 230 235 240

Ile Gln Ala His Ile Gly Ala Tyr Asp Ala Ile Lys Glu Tyr Ser Glu  
 245 250 255

Lys Ser Val Gly Val Ile Tyr Ala Phe Ala Trp His Asp Pro Leu Ala  
 260 265 270

Glu Glu Tyr Lys Asp Glu Val Glu Glu Ile Arg Lys Lys Asp Tyr Glu  
 275 280 285

Phe Val Thr Ile Leu His Ser Lys Gly Lys Leu Asp Trp Ile Gly Val  
 290 295 300

Asn Tyr Tyr Ser Arg Leu Val Tyr Gly Ala Lys Asp Gly His Leu Val  
305 310 315 320

Pro Leu Pro Gly Tyr Gly Phe Met Ser Glu Arg Gly Gly Phe Ala Lys  
325 330 335

Ser Gly Arg Pro Ala Ser Asp Phe Gly Trp Glu Met Tyr Pro Glu Gly  
340 345 350

Leu Glu Asn Leu Leu Lys Tyr Leu Asn Asn Ala Tyr Glu Leu Pro Met  
355 360 365

Ile Ile Thr Glu Asn Gly Met Ala Asp Ala Ala Asp Arg Tyr Arg Pro  
370 375 380

[0052]

His Tyr Leu Val Ser His Leu Lys Ala Val Tyr Asn Ala Met Lys Glu  
385 390 395 400

Gly Ala Asp Val Arg Gly Tyr Leu His Trp Ser Leu Thr Asp Asn Tyr  
405 410 415

Glu Trp Ala Gln Gly Phe Arg Met Arg Phe Gly Leu Val Tyr Val Asp  
420 425 430

Phe Glu Thr Lys Lys Arg Tyr Leu Arg Pro Ser Ala Leu Val Phe Gly  
435 440 445

Glu Ile Ala Thr Gln Lys Glu Ile Pro Glu Glu Leu Ala His Leu Ala  
450 455 460

Asp Leu Lys Phe Val Thr Arg Lys  
465 470

<210> 37

<211> 472

<212> PRT

<213> 强烈炽热球菌(Pyrococcus furiosus) R170A/R220A/Y227F/E449R

<400> 37

Ala Lys Phe Pro Lys Asn Phe Met Phe Gly Tyr Ser Trp Ser Gly Phe  
1 5 10 15

Gln Phe Glu Met Gly Leu Pro Gly Ser Glu Val Glu Ser Asp Trp Trp  
20 25 30

[0053] Val Trp Val His Asp Lys Glu Asn Ile Ala Ser Gly Leu Val Ser Gly  
35 40 45

Asp Leu Pro Glu Asn Gly Pro Ala Tyr Trp His Leu Tyr Lys Gln Asp  
50 55 60

His Asp Ile Ala Glu Lys Leu Gly Met Asp Cys Ile Arg Gly Gly Ile  
65 70 75 80

Glu Trp Ala Arg Ile Phe Pro Lys Pro Thr Phe Asp Val Lys Val Asp  
85 90 95

Val Glu Lys Asp Glu Glu Gly Asn Ile Ile Ser Val Asp Val Pro Glu  
100 105 110

Ser Thr Ile Lys Glu Leu Glu Lys Ile Ala Asn Met Glu Ala Leu Glu  
115 120 125

His Tyr Arg Lys Ile Tyr Ser Asp Trp Lys Glu Arg Gly Lys Thr Phe  
 130 135 140

Ile Leu Asn Leu Tyr His Trp Pro Leu Pro Leu Trp Ile His Asp Pro  
 145 150 155 160

Ile Ala Val Arg Lys Leu Gly Pro Asp Ala Ala Pro Ala Gly Trp Leu  
 165 170 175

Asp Glu Lys Thr Val Val Glu Phe Val Lys Phe Ala Ala Phe Val Ala  
 180 185 190

Tyr His Leu Asp Asp Leu Val Asp Met Trp Ser Thr Met Asn Glu Pro  
 195 200 205

[0054] Asn Val Val Tyr Asn Gln Gly Tyr Ile Asn Leu Ala Ser Gly Phe Pro  
 210 215 220

Pro Gly Phe Leu Ser Phe Glu Ala Ala Glu Lys Ala Lys Phe Asn Leu  
 225 230 235 240

Ile Gln Ala His Ile Gly Ala Tyr Asp Ala Ile Lys Glu Tyr Ser Glu  
 245 250 255

Lys Ser Val Gly Val Ile Tyr Ala Phe Ala Trp His Asp Pro Leu Ala  
 260 265 270

Glu Glu Tyr Lys Asp Glu Val Glu Glu Ile Arg Lys Lys Asp Tyr Glu  
 275 280 285

Phe Val Thr Ile Leu His Ser Lys Gly Lys Leu Asp Trp Ile Gly Val

290

295

300

Asn Tyr Tyr Ser Arg Leu Val Tyr Gly Ala Lys Asp Gly His Leu Val  
 305 310 315 320

Pro Leu Pro Gly Tyr Gly Phe Met Ser Glu Arg Gly Gly Phe Ala Lys  
 325 330 335

Ser Gly Arg Pro Ala Ser Asp Phe Gly Trp Glu Met Tyr Pro Glu Gly  
 340 345 350

Leu Glu Asn Leu Leu Lys Tyr Leu Asn Asn Ala Tyr Glu Leu Pro Met  
 355 360 365

[0055] Ile Ile Thr Glu Asn Gly Met Ala Asp Ala Ala Asp Arg Tyr Arg Pro  
 370 375 380

His Tyr Leu Val Ser His Leu Lys Ala Val Tyr Asn Ala Met Lys Glu  
 385 390 395 400

Gly Ala Asp Val Arg Gly Tyr Leu His Trp Ser Leu Thr Asp Asn Tyr  
 405 410 415

Glu Trp Ala Gln Gly Phe Arg Met Arg Phe Gly Leu Val Tyr Val Asp  
 420 425 430

Phe Glu Thr Lys Lys Arg Tyr Leu Arg Pro Ser Ala Leu Val Phe Arg  
 435 440 445

Arg Ile Ala Thr Gln Lys Glu Ile Pro Glu Glu Leu Ala His Leu Ala  
 450 455 460



Asp Leu Lys Phe Val Thr Arg Lys  
465 470

<210> 38

<211> 472

<212> PRT

<213> 强烈炽热球菌(Pyrococcus furiosus) R170A/R220A/Y227F/E459G

<400> 38

Ala Lys Phe Pro Lys Asn Phe Met Phe Gly Tyr Ser Trp Ser Gly Phe  
1 5 10 15

Gln Phe Glu Met Gly Leu Pro Gly Ser Glu Val Glu Ser Asp Trp Trp  
20 25 30

[0056] Val Trp Val His Asp Lys Glu Asn Ile Ala Ser Gly Leu Val Ser Gly  
35 40 45

Asp Leu Pro Glu Asn Gly Pro Ala Tyr Trp His Leu Tyr Lys Gln Asp  
50 55 60

His Asp Ile Ala Glu Lys Leu Gly Met Asp Cys Ile Arg Gly Gly Ile  
65 70 75 80

Glu Trp Ala Arg Ile Phe Pro Lys Pro Thr Phe Asp Val Lys Val Asp  
85 90 95

Val Glu Lys Asp Glu Glu Gly Asn Ile Ile Ser Val Asp Val Pro Glu  
100 105 110

Ser Thr Ile Lys Glu Leu Glu Lys Ile Ala Asn Met Glu Ala Leu Glu  
115 120 125

His Tyr Arg Lys Ile Tyr Ser Asp Trp Lys Glu Arg Gly Lys Thr Phe  
 130 135 140

Ile Leu Asn Leu Tyr His Trp Pro Leu Pro Leu Trp Ile His Asp Pro  
 145 150 155 160

Ile Ala Val Arg Lys Leu Gly Pro Asp Ala Ala Pro Ala Gly Trp Leu  
 165 170 175

Asp Glu Lys Thr Val Val Glu Phe Val Lys Phe Ala Ala Phe Val Ala  
 180 185 190

Tyr His Leu Asp Asp Leu Val Asp Met Trp Ser Thr Met Asn Glu Pro  
 195 200 205

[0057]

Asn Val Val Tyr Asn Gln Gly Tyr Ile Asn Leu Ala Ser Gly Phe Pro  
 210 215 220

Pro Gly Phe Leu Ser Phe Glu Ala Ala Glu Lys Ala Lys Phe Asn Leu  
 225 230 235 240

Ile Gln Ala His Ile Gly Ala Tyr Asp Ala Ile Lys Glu Tyr Ser Glu  
 245 250 255

Lys Ser Val Gly Val Ile Tyr Ala Phe Ala Trp His Asp Pro Leu Ala  
 260 265 270

Glu Glu Tyr Lys Asp Glu Val Glu Glu Ile Arg Lys Lys Asp Tyr Glu  
 275 280 285

Phe Val Thr Ile Leu His Ser Lys Gly Lys Leu Asp Trp Ile Gly Val  
 290 295 300

Asn Tyr Tyr Ser Arg Leu Val Tyr Gly Ala Lys Asp Gly His Leu Val  
 305 310 315 320

Pro Leu Pro Gly Tyr Gly Phe Met Ser Glu Arg Gly Gly Phe Ala Lys  
 325 330 335

Ser Gly Arg Pro Ala Ser Asp Phe Gly Trp Glu Met Tyr Pro Glu Gly  
 340 345 350

Leu Glu Asn Leu Leu Lys Tyr Leu Asn Asn Ala Tyr Glu Leu Pro Met  
 355 360 365

[0058] Ile Ile Thr Glu Asn Gly Met Ala Asp Ala Ala Asp Arg Tyr Arg Pro  
 370 375 380

His Tyr Leu Val Ser His Leu Lys Ala Val Tyr Asn Ala Met Lys Glu  
 385 390 395 400

Gly Ala Asp Val Arg Gly Tyr Leu His Trp Ser Leu Thr Asp Asn Tyr  
 405 410 415

Glu Trp Ala Gln Gly Phe Arg Met Arg Phe Gly Leu Val Tyr Val Asp  
 420 425 430

Phe Glu Thr Lys Lys Arg Tyr Leu Arg Pro Ser Ala Leu Val Phe Arg  
 435 440 445

Glu Ile Ala Thr Gln Lys Glu Ile Pro Glu Gly Leu Ala His Leu Ala  
 450 455 460

[0059] Asp Leu Lys Phe Val Thr Arg Lys  
 465 470

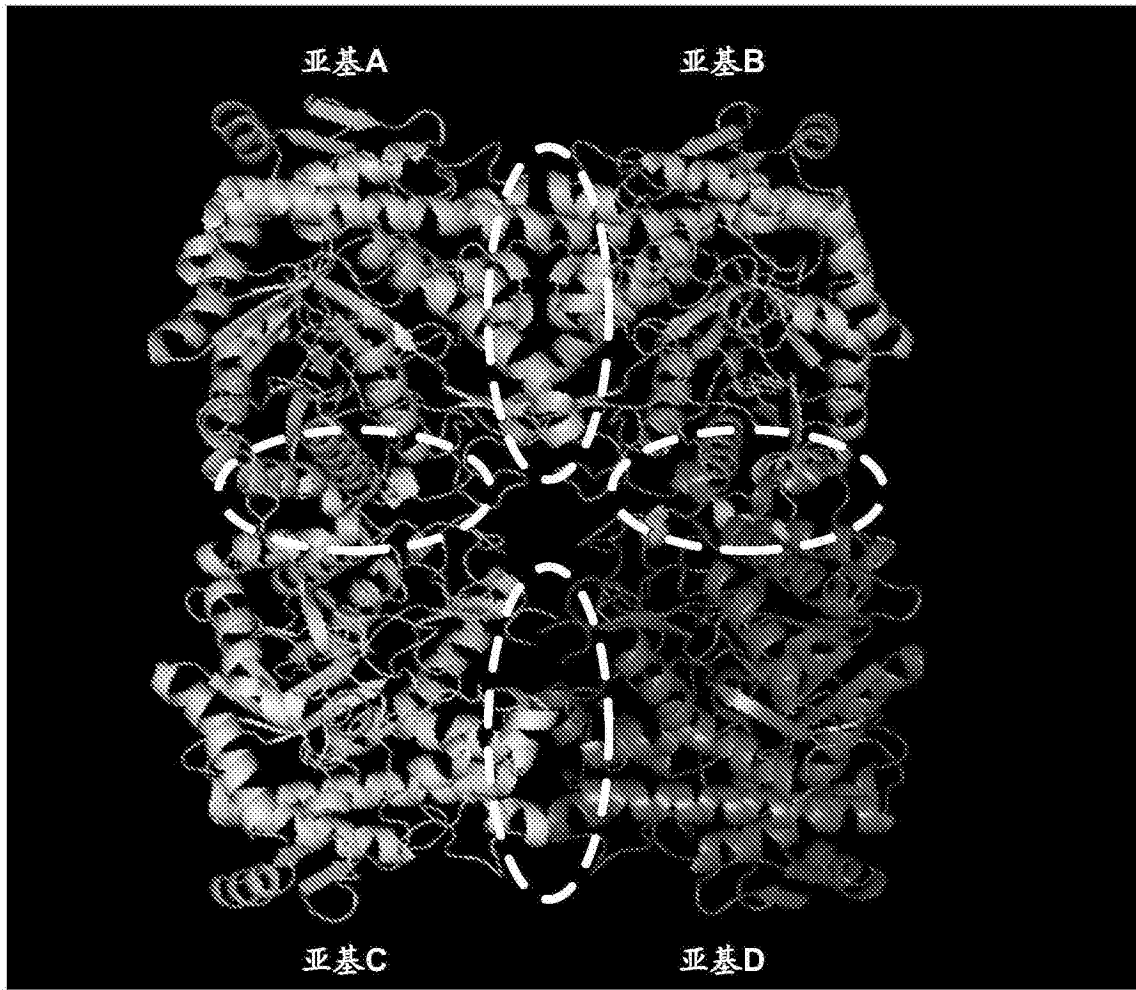


图1

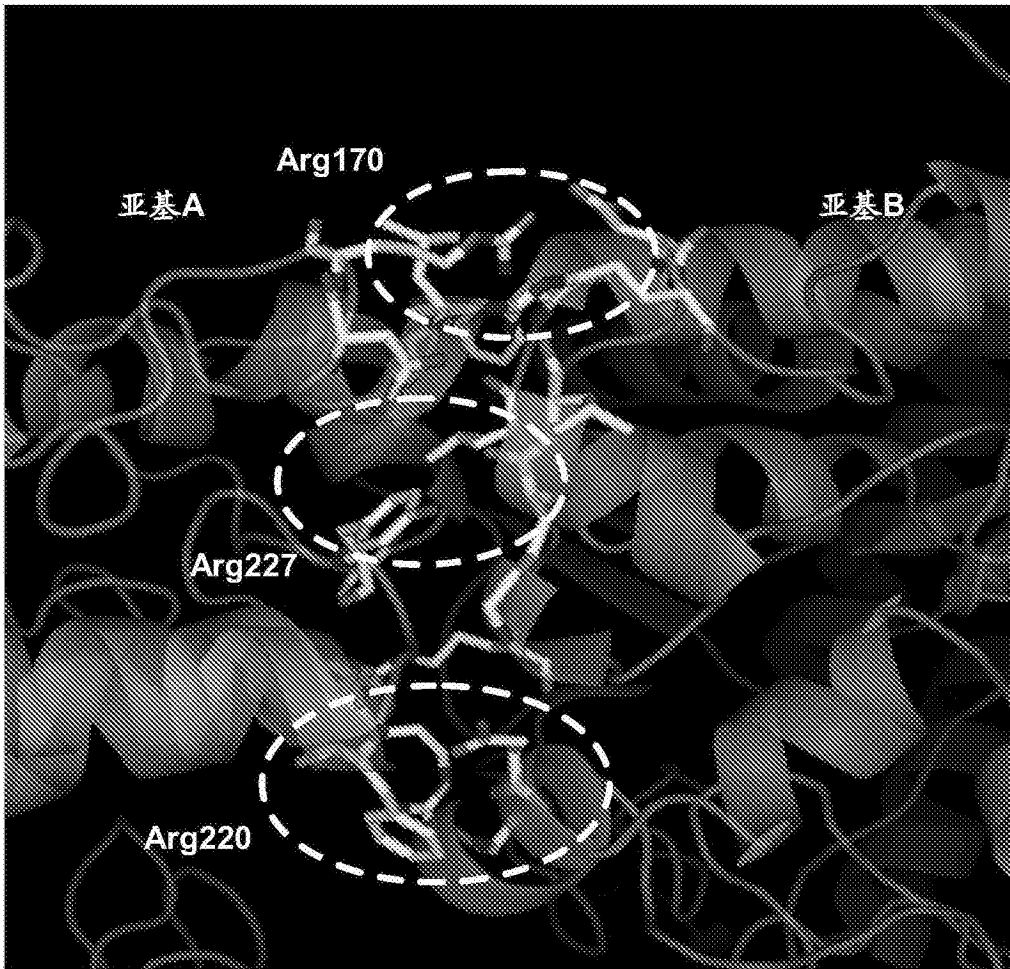


图2

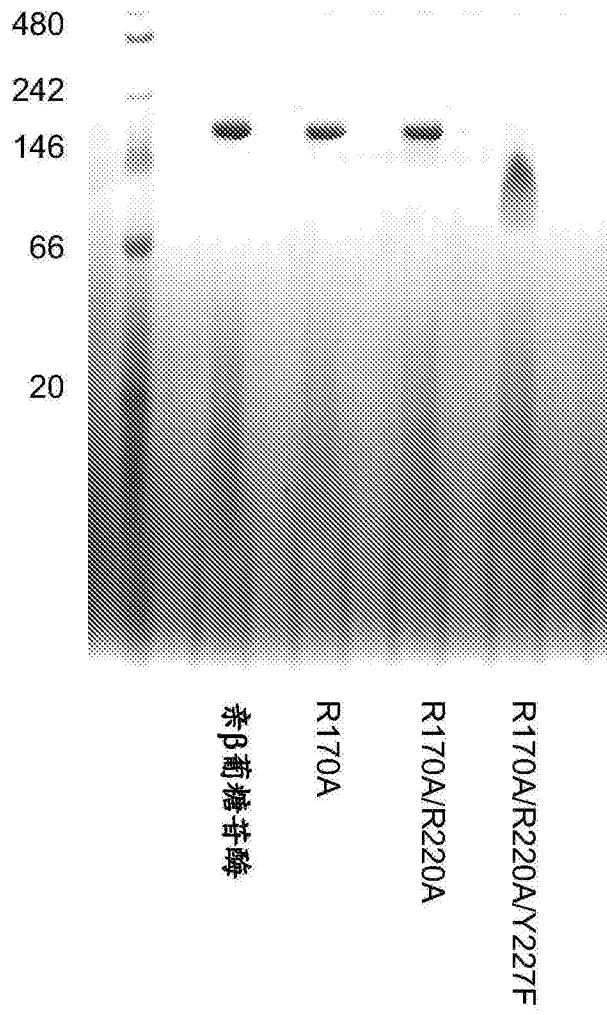


图3

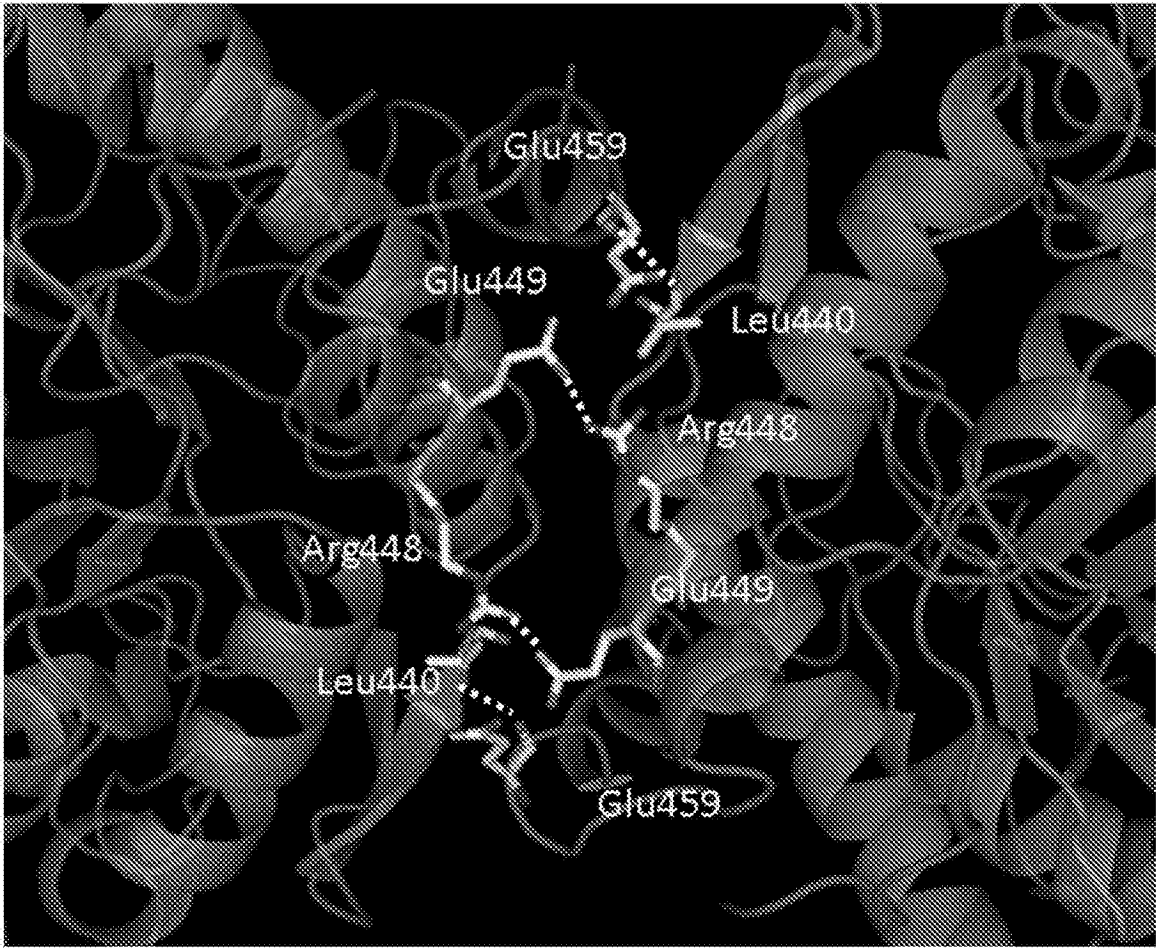


图4

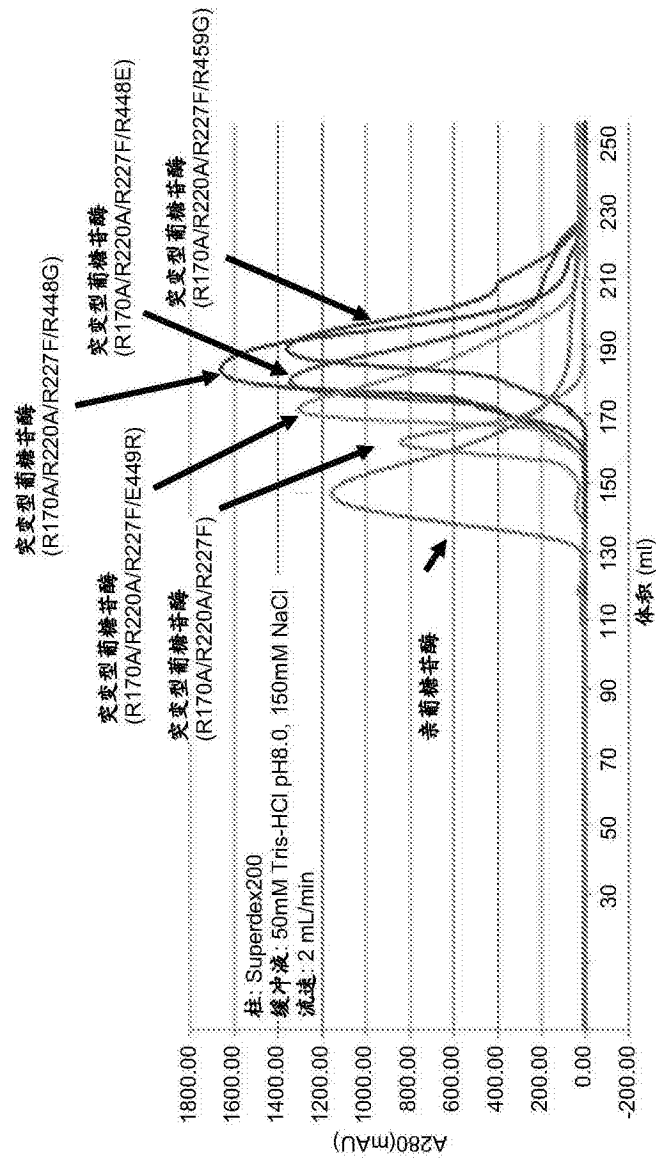


图5