
Octrooiraad



⑫ A **Terinzagelegging** ⑪ **8902128**

Nederland

⑲ NL

⑤4 **Vertakkingsenzym en gebruik daarvan.**

⑤1 Int.Cl.⁵: C12N 9/10, C12N 15/00, A23L 1/105, A23K 1/00.

⑦1 Aanvrager: Coöperatieve Verkoop- en Productievereniging van Aardappelmeel en Derivaten Avebe B.A. te Veendam.

⑦4 Gem.: Ir. Th.A.H.J. Smulders c.s.
Vereenigde Octroobureaux
Nieuwe Parklaan 107
2587 BP 's-Gravenhage.

②1 Aanvraag Nr. 8902128.

②2 Ingediend 23 augustus 1989.

③2 --

③3 --

③1 --

⑥2 --

④3 Ter inzage gelegd 18 maart 1991.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

BESCHRIJVING

vertakkingsenzym en gebruik daarvan

Gebied van de uitvinding

De uitvinding ligt op de gebieden van de recombinant DNA technologie, de microbiologie, de enzymologie en de zetmeel- en voedingsmiddelentechnologie. De uitvinding betreft een bepaald
5 enzym, dat bijv. voor de bereiding van voedingsmiddelen kan worden benut, en betreft het voor het enzym coderende gen, dat door de uitvinders gekloneerd is en gebruikt kan worden voor transformatie van een voor produktie van het enzym geschikt organisme.

10 Meer in het bijzonder heeft de uitvinding betrekking op een vertakkingsenzym van microbiële oorsprong, op een gebruik van dit vertakkingsenzym voor het modificeren van een zetmeelachtig materiaal, bijvoorbeeld in het kader van een werkwijze voor het bereiden of vervaardigen van voedingsmiddelen voor mens of dier,
15 alsmede op een recombinant polynucleotide (in het bijzonder recombinant DNA, bijv. in de vorm van een chimeer plasmide) dat de genetische informatie omvat die voor het vertakkingsenzym codeert.

20 Achtergrond van de uitvinding

Diverse microorganismen (een term die hier in zijn ruime betekenis wordt gebruikt en derhalve zowel bacteriën, als ook andere kleine organismen zoals schimmels, gisten en algen omvat) beschikken over een bij de biosynthese van glycogeen betrokken
25 enzym, dat bekend staat als vertakkingsenzym. Dit enzym is een transferase dat bij zetmeelachtige substraten, zoals amylose, amylopectine, zetmeel, dextrine en daarvan afgeleide, uit α -D-glucose opgebouwde polysacchariden, tot de vorming van $\alpha(1\rightarrow6)$ vertakkingen leidt. De systematische naam van dit enzym is 1,4-
30 α -D-glucan:1,4- α -D-glucan 6- α -D-(1,4- α -D-glucano)-transferase, of EC 2.4.1.18. Glycogeen is een aan de plantaardige zetmeelcomponent amylopectine verwant polyglucose materiaal, dat in

dieren en diverse microorganismen als koolstof- en energie-opslagmateriaal dienst doet. Evenals amylopectine is glycogeen een vertakt polyglucose materiaal, maar de vertakkingsfrequentie is bij glycogeen groter dan bij amylopectine. Het vertakkings-
5 enzym is nodig om de $\alpha(1\rightarrow6)$ vertakkingen van het glycogeen te vormen.

Inmiddels zijn diverse vertakkingsenzymen van microbiële oorsprong geïsoleerd en nader onderzocht. Uit het Amerikaanse octrooischrift 4.454.161 is bijv. een uit Bacillus megaterium
10 geïsoleerd vertakkingsenzym bekend. Dit enzym is stabiel tot ongeveer 45 °C en vertoont een optimum van de enzymactiviteit bij een temperatuur van ongeveer 25 °C.

Uit een artikel van Boyer en Preiss in Biochemistry 16, 1977, 3693-3699 is een vertakkingsenzym uit Escherichia coli
15 bekend. Uit Baecker et al, J. Biol. Chem. 261, 1986, 8738-8743 is de nucleotidenvolgorde van het voor dit vertakkingsenzym coderende glgB gen bekend, evenals de daarmee corresponderende aminozuurvolgorde van het enzym. Dit E. coli enzym heeft een uit de aminozuursamenstelling berekend molekuulgewicht van 84231.

20 Door Zevenhuizen, Biochim. Biophys. Acta 81, 1964, 608-611 is een vertakkingsenzym uit Arthrobacter globiformis beschreven.

Door Walker en Builder, Eur. J. Biochem. 20, 1971, 14-21 is een vertakkingsenzym van Streptococcus mitis beschreven.

25 Door Steiner en Preiss, J. Bacteriol. 129, 1977, 246-253 is een vertakkingsenzym van Salmonella typhimurium beschreven.

Door Fredrick is in J. Thermal Biol. 3, 1978, 1-4 en in Phytochemistry 19, 1980, 539-542 een vertakkingsenzym uit de alge Cyanidium caldarium beschreven.

30 Door Kiel et al, Gene 78, 1989, 9-17 zijn de klonering en expressie in E. coli van het voor een vertakkingsenzym van Synechococcus sp. PCC 7942 (of Anacystis nidulans R2) coderende gen beschreven. Het gen codeert voor 2 eiwitten, waarvan het grootste, blijkens de inmiddels bepaalde nucleotidenvolgorde van het daarvoor coderende glgB gen, een molekuulgewicht heeft van
35 89206. De enzymactiviteit van dit vertakkingsenzym vertoont een optimum bij een temperatuur van ongeveer 35 °C. Het kleinere

eiwit heeft een molekulgewicht van ca. 72 kDa en is eveneens enzymatisch actief.

Zoals in het hierboven reeds genoemde Amerikaanse octrooi-schrift 4.454.161 is uiteengezet, kan vertakkingsenzym worden
5 benut voor een verbetering van de kwaliteit van uiteenlopende voedingsmiddelen. De neiging van zetmeelachtige materialen tot retrogradatie, waardoor de bewaartijd en verteerbaarheid van voedingsmiddelen die deze materialen bevatten afnemen, kan door het introduceren van $\alpha(1\rightarrow6)$ vertakkingen met behulp van een
10 vertakkingsenzym worden tegengegaan.

Een nadeel van alle tot dusver bekend geworden vertakkingsenzymen is echter dat ze bij verhoogde temperaturen niet erg actief en zelfs instabiel zijn. Dit legt grote beperkingen op aan de wijze waarop een te modificeren zetmeelachtig materiaal
15 of een voor consumptie door mens of dier bestemd produkt, dat een te modificeren zetmeelachtig materiaal bevat, kan worden behandeld. Om verschillende redenen kan een behandeling bij verhoogde temperaturen, bijv. bij een temperatuur boven 45 °C, de voorkeur verdienen of zelfs nodig zijn. Wanneer bij hogere
20 temperaturen kan worden gewerkt, kunnen bijv. hogere zetmeelconcentraties worden gebruikt, hetgeen voor vele toepassingen op technische schaal gewenst is. Met de bekende vertakkingsenzymen is dat niet mogelijk.

Van verschillende enzymen is het bestaan van thermostabele
25 varianten bekend. Zo is bijv. uit de Europese octrooiaanvraag EP-A-0057976 een thermostabiel alfa-amylase enzym bekend, dat afkomstig is van bacteriën van een Bacillus stearothermophilus stam. In deze Europese octrooiaanvraag wordt de klonering en expressie van dit thermostabele alfa-amylase in E. coli en in
30 B. subtilis beschreven. Alfa-amylase is een enzym, dat voor een hydrolytische afbraak van zetmeelachtige materialen kan worden gebruikt, bijv. voor de bereiding van glucose-siroop uit maiszetmeel.

Voorts is uit het Amerikaanse octrooischrift 4.612.287 een
35 thermostabiel pullulanase enzym bekend, dat afkomstig is van het anaerobe microorganisme Thermoanaerobium brockii. In dit Amerikaanse octrooischrift wordt de klonering en expressie van dit

thermostabiele pullulanase enzym in E. coli en in B. subtilis beschreven. Pullulanase is een enzym, dat specifiek de afbraak van $\alpha(1\rightarrow6)$ glucoside-bindingen katalyseert en dat derhalve bij amylopectine en soortgelijke zetmeelmaterialen tot een afname van het aantal vertakkingen leidt.

Totnogtoe zijn echter geen thermostabiele varianten van het vertakkingsenzym beschreven.

Beschrijving van de uitvinding

De uitvinding voorziet nu in de bestaande behoefte aan een thermostabiel vertakkingsenzym en verschaft in het bijzonder een vertakkingsenzym van microbiële oorsprong, verkregen door isolatie uit een organisme dat in staat is om het enzym tot expressie te brengen, welk nieuwe vertakkingsenzym volgens de uitvinding gekenmerkt wordt door een stabiliteit van het enzym bij temperaturen tot ten minste 50 °C en een optimum van de enzymatische activiteit bij een temperatuur boven 45 °C.

Een voorkeursuitvoeringsvorm van de uitvinding betreft een vertakkingsenzym, dat gekenmerkt wordt door een afkomst van bacteriën van de soort Bacillus stearothermophilus, meer in het bijzonder door een afkomst van bacteriën van de stam Bacillus stearothermophilus 1503-4R var.4.

Hoewel het bekende thermofiele microorganisme Bacillus stearothermophilus normaliter geen waarneembare hoeveelheden glycogeen vormt, is de bovenstaand genoemde spontane variant Bacillus stearothermophilus 1503-4R var.4 in staat om aan het eind van de logaritmische groeifase een vertakt glucan op te hopen, waarin de gemiddelde ketenlengte van de vertakkingen bij 21 glucose-residuen ligt. Door Goldemberg is in artikelen in Biochim. Biophys. Acta 177, 1969, 166-168 en in Arch. Biochem. Biophys. 149, 1972, 252-258, alsmede in het boek "Biochemistry of the glycosidic linkage", vol.2, 1972, 621-627 over de glucan biosynthese van de genoemde variant gerapporteerd. Van een isolatie, karakterisering en klonering van het verantwoordelijke vertakkingsenzym is echter in deze publikaties geen sprake.

De onderhavige uitvinders hebben het glgB gen van Bacillus stearothermophilus 1503-4R var.4, dat voor zijn thermostabiele

vertakkingsenzym codeert, gekloneerd, gekarakteriseerd en tot
expressie gebracht in *E. coli* en *B. subtilis*. Uit de door hen
bepaalde nucleotidenvolgorde kon de aminozuurvolgorde worden
afgeleid, en daaruit het molekulgewicht van het thermostabiele
5 vertakkingsenzym worden berekend op 74787. Het enzym bestaat uit
639 aminozuur-residuen (zie fig. 4). Verder hebben de uitvinders
de enzymatische activiteit van het desbetreffende thermostabiele
vertakkingsenzym onderzocht. Daarbij werd vastgesteld, dat het
enzym tot een temperatuur van ten minste 65 °C stabiel is en een
10 optimale activiteit vertoont bij een temperatuur van ongeveer
53 °C.

Hoewel de uitvinders blijkens het experimentele gedeelte
van deze aanvraag het *glgB* gen van *Bacillus stearothermophilus*
alleen nog maar in *E. coli* en in *B. subtilis* tot expressie
15 hebben gebracht, heeft een deskundige aan de hierin verstrekte
informatie voldoende om het gen ook in andere gastheren tot
expressie te brengen. Doorgaans zal alleen een aanpassing van de
regulatie-elementen en van de transformatiemethode nodig zijn,
d.w.z. dat bijv. een expressie in melkzuurbacteriën zal kunnen
20 worden gerealiseerd door het structurele *glgB* gen in een voor
melkzuurbacteriën bruikbare expressiecassette in te bouwen en
een voor de transformatie van melkzuurbacteriën geschikte vector
te gebruiken. Het gebruik van andere microorganismen kan om
verschillende redenen voorkeur verdienen, bijv. om veiligheids-
25 redenen (melkzuurbacteriën behoren tot de zg. GRAS bacteriën,
hetgeen voor voedingsmiddeltoepassingen een belangrijk voordeel
is) of om redenen van produktiviteit. De uitvinding maakt het
verder mogelijk om een hoge produktie van het vertakkingsenzym
te realiseren door voor dat doel geschikte regulatie-elementen
30 te gebruiken, zoals een sterke transcriptie-promoter.

Uiteraard is de uitvinding niet beperkt tot het van *B.*
stearothermophilus afkomstige vertakkingsenzym met de in fig.4
weergegeven aminozuurvolgorde. Mutanten van dit enzym met een
afwijkende aminozuurvolgorde worden door de uitvinding eveneens
35 omvat, mits ze actief zijn en aan de gestelde eisen ten aanzien
van stabiliteit en activiteit bij hogere temperaturen voldoen.
Hetzelfde geldt voor overeenkomstige enzymen, die afkomstig zijn

uit andere microorganismen. Voor wat het voor het thermostabiele
vertakkingsenzym coderende gen betreft, is de uitvinding niet
beperkt tot de in fig.4 weergegeven nucleotidensequentie, maar
omvat mutanten daarvan, die dankzij het ontaard zijn van de
5 genetische code voor een enzym met dezelfde aminozuurvolgorde
coderen, alsmede mutanten die voor een mutant enzym coderen
indien het mutante enzym aan de hierboven gestelde voorwaarden
voldoet, en in ruimere zin elk gen van microbiële oorsprong dat
codeert voor een thermostabiel vertakkingsenzym zoals hierin
10 gedefiniëerd. De uitvinding omvat recombinante polynucleotiden
(bij voorkeur DNA, maar recombinant RNA wordt eveneens omvat)
die een dergelijk gen bevatten. Dergelijke recombinante poly-
nucleotiden kunnen voorts regulatie-elementen omvatten, zoals
een voor de gekozen gastheer geschikte transcriptie-promoter, en
15 kunnen tevens een vectorgedeelte omvatten en de vorm hebben van
een chimeer plasmide, dat een vectorplasmide omvat met daarin
een insertie van DNA, die een transcriptiepromoter en eventueel
andere regulatie-elementen, alsmede DNA dat codeert voor een
thermostabiel vertakkingsenzym volgens de uitvinding omvat.

20 De uitvinding strekt zich ook uit over het gebruik van het
nieuwe thermostabiele vertakkingsenzym volgens de uitvinding in
werkwijzen voor het modificeren van een zetmeelachtig materiaal,
zoals zetmeel, amylose, amylopectine, dextrine, en andere poly-
glucose materialen, en over het aldus verkregen, gemodificeerde
25 zetmeelachtig materiaal. Met modificeren wordt uiteraard een
introduceren van (extra) vertakkingen bedoeld.

Voorts wordt de uitvinding belichaamd in een werkwijze voor
het bereiden of vervaardigen van een voor consumptie door mens
of dier geschikt produkt (voedingsmiddelen en diervoeders), welk
30 produkt een zetmeelachtig materiaal omvat, dat door behandeling
met een vertakkingsenzym volgens de uitvinding is gemodificeerd.

De uitvinding zal nu verder worden toegelicht aan de hand
van de tekening en het hiernavolgende experimentele gedeelte.

35 Figuurbeschrijving

Figuur 1 toont de kaart van het plasmide pKVS242, dat voor
een deel afkomstig is van het uitgangsplasmide pHP13 (dunne

lijnen). Inserties zijn met dikke lijnen aangeduid. De vette pijl vertegenwoordigt de SPO2 promoter. Het open blok stelt het coderende gebied van het Bacillus stearothermophilus (Bst) glgB gen voor. De afkortingen hebben de gebruikelijke betekenissen:

- 5 Em^F duidt op het erythromycine resistentie-gen,
 Cm^F duidt op het chloramphenicol resistentie-gen,
 ori duidt op de replicatie-oorsprong,
 E duidt op een EcoRI site, B duidt op een BamHI site, en H duidt op een HindIII site.

- 10 Figuur 2 toont de kaart van het plasmide pKSZ14, waarbij het gearceerde blok het coderende gebied van het glgB-lacZ fusie gen voorstelt. Voor de gebruikte afkortingen geldt wat voor fig.1 is opgemerkt, en geldt voorts:

- Δ duidt op een afgeknot gen,
 15 mcs duidt op een multiple cloning site,
 Plac geeft de plaats en orientatie van de lacZ promoter aan,
 P duidt op de putatieve Bst glgB promoter,
 * duidt op de plaats van een NcoI-XmnI fusie,
 ► duidt op de plaats en orientatie van de T1T2 terminators.

- 20 Figuur 3 toont de restrictiekaart van het plasmide pKVS1. De dunne lijn geeft de Bst insertie aan, terwijl de vette lijn het van de vector pUC9 afkomstige DNA aanduidt. De gearceerde gebieden geven de fragmenten aan, die het sterkste met de E. coli glgB probe hybridiseerden.

- 25 Figuur 4 toont de nucleotidensequentie van het Bst glgB gen (de anti-sense streng van het 2,7 kb EcoRI-SacI fragment) en de aminozuurvolgorde van het daardoor gecodeerde vertakkingsenzym. Het open leesraam, beginnend bij nucleotide 325, is aangegeven als ORF2. Putatieve ribosoombindingsplaatsen zijn onderstreept.
 30 Putatieve promoters zijn met vetgedrukte letters aangegeven. De pijlen, stroomafwaarts van het Bst glgB gen, wijzen op een gebied van tweetallige symmetrie.

- Figuur 5 toont de activiteit van het Bst vertakkingsenzym, en het effect van de temperatuur op die activiteit. De vertakkingsactiviteit werd bepaald in een met DEAE gezuiverd preparaat
 35 van B. stearothermophilus 1503-4R var.4 (kruisjes in paneel A) en in extracten van E. coli KV832[pKVS242] (open vierkantjes in

paneel B) en *B. subtilis* 5GM(amy) [pKVS242] (massieve bolletjes in paneel B) door de toename van het aantal 1,6- α -glucosidebindingen in amylopectine bij de aangegeven temperaturen te meten. Een eenheid van activiteit werd gedefiniëerd als de hoeveelheid
 5 enzym, die nodig was om per minuut 1 μ mol α -1,6-glucosidebindingen in het substraat te introduceren.

Figuur 6 toont de expressie van de *Bst glgB* promoter in *B. subtilis*. De groeikrommen (massieve bolletjes) en het ontstaan van β -galactosidase activiteit door een correcte *glgB-lacZ* fusie
 10 (kruisjes) voor *B. subtilis* 8G5[pKSZ14] gekweekt op selectief TY-voedingsmedium (paneel A) of gekweekt op een met 0,5 % glucose aangevuld selectief TY-voedingsmedium (paneel B), en voor *B. subtilis* IS233[pKSZ14] gekweekt op selectief TY-voedings-
 15 medium (paneel C) worden in deze figuur getoond. De specifieke β -galactosidase activiteiten zijn uitgedrukt in Miller eenheden per ml monster. De tijd start op het moment van verdunning in vers medium.

Experimenteel gedeelte

20

Klonering van het *glgB* gen van *B. stearothermophilus*

Er werd een kruishybridisatie experiment uitgevoerd, waarin DNA van *B. stearothermophilus* na knippen met *HindIII* en *BamHI* bij 58 °C en 61 °C werd gehybridiseerd met een daarbij als probe
 25 fungerend 1,2 kb *BamHI* fragment. Dit 1,2 kb *BamHI* fragment werd geïsoleerd uit plasmide pOP190 en bevat nucleotiden 256-1464 van het *E. coli glgB* gen. De resultaten van de Southern blot analyse worden hier niet getoond.

Voor de klonering werd een *HindIII* fragment van ongeveer
 30 6 kb gekozen, dat een sterke hybridisatie met de *E. coli glgB* probe vertoonde en voldoende groot is om het *Bst glgB* gen te kunnen bevatten (aannemende dat dit gen vergelijkbaar in grootte zou zijn met de *glgB* genen van *E. coli* en *Synechococcus* sp., die resp. 2,2 en 2,3 kb zijn). Hiertoe werd de *Bst* DNA *HindIII*
 35 fractie van 4-7 kb geïsoleerd en gekloneerd in de *HindIII* site van het plasmide pUC9, waarna getransformeerd werd naar *E. coli* KV832. Recombinante kolonies werden op nitrocellulose filters

1988.

overgebracht en bij 58 °C gehybridiseerd onder toepassing van het 1,2 kb BamHI fragment van het E. coli glgB gen als probe. Aangezien dit fragment in het chromosoom van E. coli KV832 is gedeleteerd, zullen alleen kloons hybridiseren die Bst inserties dragen welke in sequentie overeenkomst vertonen met de E. coli glgB probe. Positieve kolonies werden geanalyseerd door het vervaardigen van restrictiekaarten en werden door aanvullende kruishybridisatie experimenten getest. Een plasmide met daarin een 6,1 kb HindIII fragment, dat een sterke hybridisatie met de E. coli glgB probe vertoonde, werd geselecteerd en aangeduid als pKVS1.

Karakterisering van pKVS1

In figuur 3 is de restrictiekaart van pKVS1 weergegeven. Ook zijn de restrictiefragmenten van de Bst insertie, die met de E. coli probe hybridiseerden, aangegeven. Het plasmide pKVS1 gaf geen expressie van het Bst glgB gen, zoals werd geconcludeerd uit zijn onvermogen tot complementatie van E. coli glgB. In een complementatie experiment met het plasmide pKVS2 (een derivaat van pKVS1 waarin de Bst insertie in tegengestelde orientatie in pUC9 is gekloneerd) werden de kolonies na kleuren met jodium echter bruin, hetgeen duidt op de aanwezigheid van een vertakt polyglucose. Dit resultaat geeft aan dat het pUC9 een voor een vertakkingsenzym coderend DNA fragment draagt.

25

Nucleotidensequentie van het Bst glgB gen

Van een 2,7 kb EcoRI-SacI fragment, dat het gekloneerde gen en de flankerende gebieden bevatte, werd de nucleotidensequentie bepaald. Analyse van de in figuur 4 getoonde sequentie laat een open leesraam van 1917 nucleotiden coderend voor een polypeptide van 639 aminozuren zien. Een (in fig.4 onderstreepte) Shine-Dalgarno achtige sequentie bevindt zich stroomopwaarts van het initiatie-triplet TTG. De sterkte van de wisselwerking tussen deze putatieve S.D. sequentie en het 3' uiteinde van het gram-positieve 16S rRNA werd volgens Tinoco et al, Nature 246, 1973, 40-41 berekend op $\Delta G = -15,2$ kcal/mol, hetgeen een voor gram-positieve ribosoombindingsplaatsen normale waarde is.

35

Stroomopwaarts van het Bst glgB gen werden geen sequenties gevonden, die overeenkomst vertonen met de consensus -35 en -10 gebieden welke door het belangrijkste vegetatieve B. subtilis RNA polymerase E- σ^A worden herkend. Wel werd een sterke homologie
 5 waargenomen tussen het aan de S.D. sequentie voorafgaande gebied (in fig.4 is dit gebied met vetgedrukte letters aangeduid) en de consensus sequentie voor promoters die door het sigma factor H bevattende B. subtilis RNA polymerase E- σ^H worden herkend.

Verder stroomopwaarts van het coderende gebied van het Bst glgB gen is het N-terminale deel van een tweede open leesraam
 10 aanwezig. Dit in fig.4 met ORF2 aangeduide open leesraam strekt zich uit over de EcoRI site (nucleotide 1 van de sequentie). Er werden geen overeenkomsten tussen de partiële aminozuurvolgorde van ORF2 en bekende aminozuursequenties waargenomen. Stroomop-
 15 waarts van het ATG initiatie codon van ORF2 bevindt zich een (in fig.4 onderstreepte) putatieve S.D. sequentie met een ΔG voor binding aan het 3' uiteinde van het grampositieve 16S rRNA van -14,2 kcal/mol. Verder is stroomopwaarts van deze S.D. sequentie een in fig.4 met vetgedrukte letters aangeduide sequentie aan-
 20 wezig, die lijkt op de door E- σ^A herkende -35 en -10 gebieden. Tussen de twee putatieve promoters ligt een A/T rijk gebied.

Elf nucleotiden stroomafwaarts van het translatie-terminatie codon TAA van het Bst glgB gen is een uitgestrekt gebied met tweetallige symmetrie aanwezig. Dit gebied kan bij
 25 transcriptie in RNA een "stem-loop" structuur vormen met een ΔG van -104 kcal/mol. Dit gebied lijkt echter niet een van rho onafhankelijke transcriptie-terminatie plaats te zijn, aangezien een thymine-rijk gebied onmiddellijk stroomafwaarts van de "stem-loop" structuur ontbreekt.

30

Aminozuurvolgorde van het Bst vertakkingsenzym

Uit de in fig.4 getoonde aminozuurvolgorde blijkt dat het Bst vertakkingsenzym een molekulgewicht heeft van 74787, dus aanzienlijk kleiner dan de molekulgewichten van de bekende
 35 vertakkingsenzymen van E. coli (Ec) en Synechococcus sp. (An), die resp. 84 en 89 kDa zijn. Bij een vergelijking van de aminozuurvolgorden van deze vertakkingsenzymen is vastgesteld dat het

grampositieve vertakkingsenzym de N-terminus van de gramnegatieve enzymen mist. Hoewel de aminozuursequenties van de Bst, Ec en An vertakkingsenzymen in het middengedeelte van de eiwitten grote overeenstemming vertonen, is de totale homologie ten
 5 gevolge van de zeer beperkte overeenstemming in het N-terminale gedeelte betrekkelijk gering.

Codon gebruik en G+C gehalte van het Bst glgB gen

Uit een vergelijking van het codon gebruik in de genoemde
 10 glgB genen zijn grote verschillen tussen de grampositieve en gramnegatieve genen naar voren gekomen. In de gramnegatieve genen zeldzame codons zoals TTA, ATA, GTA, ACA, AAA, CGA, AGA en GGA worden veel gebruikt in het Bst glgB gen. Verder blijkt er in het grampositieve glgB gen op alle posities, maar vooral op
 15 de derde positie van de codons een sterke weerstand tegen G en C te bestaan. In de gramnegatieve genen bestaat daarentegen juist een duidelijke voorkeur voor C en weerstand tegen A op de derde positie van de codons. Het G+C gehalte van het Bst glgB gen (40,8 %) is dan ook opvallend veel lager dan dat van de gram-
 20 negatieve Ec en An glgB genen (resp. 53,2 en 56,5 %).

Aminozuursamenstelling

Ook in de aminozuursamenstelling blijken er nogal grote verschillen tussen de genoemde vertakkingsenzymen te bestaan. Zo
 25 heeft het Bst vertakkingsenzym een veel lager arginine en een veel hoger lysine gehalte dan de vertakkingsenzymen van de gramnegatieve bacteriën, en bevat het grampositieve enzym een veel groter aantal hydrofobe aminozuren (Phe, Trp, Tyr, Ile, Leu, Met en Val), nl. 39,3 % t.o. slechts 34,9 % in de enzymen
 30 van de gramnegatieve bacteriën.

Expressie van het Bst glgB gen in E. coli en B. subtilis

Expressie van het Bst vertakkingsenzym in E. coli, getransformeerd met pKVS2, was nogal zwak. Er werd een shuttle plasmide
 35 pKVS242 geconstrueerd om in E. coli een sterkere expressie te verkrijgen en om ook expressie in B. subtilis te verkrijgen. Dit in figuur 1 weergegeven plasmide werd geconstrueerd door een uit

pKVS1 geknipt 4,3 kb EcoRI-HindIII fragment met daarin het volledige Bst glgB gen te ligeren in pHP13, dat met dezelfde restrictie-enzymen was geknipt, en vervolgens de zeer sterke B. subtilis faag SPO2 promoter (Williams et al, J. Bacteriol. 146, 5 1981, 1162-1165) als een 280 bp EcoRI fragment in de unieke EcoRI site te inserteren. Dit 280 bp EcoRI fragment werd geïsoleerd uit het plasmide pGKV21, dat beschreven is door van der Vossen et al in Appl. Environ. Microbiol. 50, 1985, 540-542. Uit zijn vermogen tot complementatie van E. coli KV832 bleek dat 10 pKVS242 in staat is om het Bst glgB gen tot expressie te brengen.

Uit pKVS242 bevattende bacteriën van de bacteriestammen E. coli KV832 en B. subtilis 5GM(amy) werden extracten bereid. De activiteit en het effect van de temperatuur op de activiteit 15 van het vertakkingsenzym in deze extracten werden bepaald en vergeleken met een DEAE-gezuiverd enzympreparaat van Bst 1503-4R var.4. De in figuur 5 getoonde resultaten wijzen uit, dat het aantal α -1,6-glucosidebindingen in amylopectine door extracten uit pKVS242 bevattende cellen op een efficiënte wijze wordt 20 vergroot. In controleproeven met extracten uit KV832[pHP13] en 5GM(amy) [pHP13] werden waarden beneden 1 milli-eenheid per ml gemeten. Verder lag de activiteit in KV832[pKVS2] maar net boven de achtergrond(de gegevens worden hier niet getoond). Figuur 5 laat ook zien dat in alle gevallen de optimale vertakkings- 25 activiteit bij ongeveer 53 °C werd verkregen, waaruit de thermostabiele aard van het gekloneerde enzym blijkt.

Groefase-afhankelijke expressie in B. subtilis

Om te testen, of bij gebruik van een door E- σ^H herkende 30 promoter transcriptie van het Bst glgB gen plaats vindt, werd het in figuur 2 getoonde plasmide pKSZ14 geconstrueerd, dat een glgB-lacZ fusie-gen (met een correct leesraam) bevat. Het plasmide werd geconstrueerd uit 4 fragmenten, namelijk een uit pKVS1 geïsoleerd 840 bp EcoRI-BamHI fragment dat het 5' uiteinde 35 van het Bst glgB gen met inbegrip van de putatieve transcriptie en translatie regulatie elementen bevat; de met NcoI (blunt gemaakt) en EcoRI geknipte B. subtilis/E. coli shuttle vector

pHP13; een uit pMLB1034 geknipt 4,3 kb BamHI-XmnI fragment dat een afgeknot lacZ gen bevat; en een 500 bp EcoRI fragment dat de E. coli rrnB T1T2 terminators bevat (Brosius, Gene 27, 1984, 161-172). Het glgB-lacZ fusie-gen codeert voor een fusie-eiwit met β -galactosidase activiteit. Verder stopt de T1T2 terminator transcriptie die stroomopwaarts van het fusie-gen bij de lacZ promoter begint en een nauwkeurige bepaling van de activiteit van de putatieve Bst glgB promoter zou hinderen. Bij een transformatie van B. subtilis 8G5 met pKSZ14 werden na langdurige groei op XGal bevattende selectieve TY agar platen blauwe kolonies verkregen.

In paneel A van figuur 6 is het expressiepatroon van de β -galactosidase activiteit in B. subtilis 8G5[pKSZ14] getoond. Tijdens vegetatieve groei werd geen toename van de activiteit waargenomen. Kennelijk was de promoter van het Bst glgB gen in deze groeifase uitgeschakeld (de gemeten β -galactosidase activiteit is waarschijnlijk de restactiviteit van de overnacht cultuur die als inoculum was gebruikt). Aan het einde van de exponentiële groeifase steeg de β -galactosidase activiteit snel, hetgeen erop duidt dat het gen in de latere groeistadia tot expressie wordt gebracht. Wanneer de cellen in medium werden gekweekt, dat met glucose was aangevuld, kon daarentegen nauwelijks enige activiteit worden gedetecteerd (zie paneel B in fig.6). Hoewel het expressiepatroon van β -galactosidase gelijk bleef, werd een 500-voudige vermindering van de activiteit waargenomen. Deze resultaten bevestigen dat het Bst glgB gen niet door $E-\sigma^A$ tot expressie komt, maar dat een of meer van de ondergeschikte sigma factors betrokken zijn bij de expressie van het gen in B. subtilis. Afhankelijkheid van $E-\sigma^H$ werd getest door plasmide pKSZ14 in B. subtilis IS233 te brengen, welke stam sigma factor H mist. De in paneel C van fig.6 getoonde resultaten laten zien dat dan zeer weinig β -galactosidase activiteit wordt verkregen. Kennelijk is dus inderdaad sigma factor H betrokken bij de expressie van het Bst glgB gen in B. subtilis.

Bacteriën, plasmiden, media en (bio)chemicaliën

De gebruikte bacteriestammen en plasmiden zijn onderstaand aangegeven. De daarin vermelde *B. subtilis* stam 5GM(amy) werd verkregen door congressie na transformatie van competente 6GM
5 cellen met DNA van *B. subtilis* stam 1-85(amy) en selectie voor *tyr*⁺ recombinanten.

B. subtilis

- 8G5 trpC2 met his ura rib tyr nic purA
10 Bron en Venema, Mutation Res. 15, 1972, 1-10
- 6GM trpC2 met his ura rib tyr r_M⁻ m_M⁺
 Haima et al, Mol. Gen. Genet. 209, 1987, 335-342
- 5GM(amy) trpC2 met his ura rib amy r_M⁻ m_M⁺
 zie de hierboven gegeven beschrijving
- 15 1-85 trpC2 amy
 Yuki, J. Genet. 42, 1967, 251-261
- IS233 trpC2 phe-1 spoOH⁺Hind
 Weir et al, J. Bacteriol. 157, 1984, 405-412

B. stearothermophilus

- 20 1503-4R variant van *B. stearothermophilus* 1503-4R die glucan
var.4 ophoopt
 Goldemberg en Algranati, Biochim. Biophys. Acta 177,
 1969, 166-168

E. coli

- 25 KV832 F⁻ ara Δ(lac-pro) thi strA Φ80dlacZAM15 AglgB1200::Km^r
 Kiel et al, Mol. Gen. Genet. 207, 1987, 294-301
- JM101 supE thi Δ(lac-proAB⁻) [F'⁺traD36 proAB⁺ lacI^q lacZAM15]
 Messing, Recombinant DNA Technical Bulletin, NIH publ.
 No.79-99, vol.2, No.2, 1979, 43-48

30

plasmiden

- pUC9 Ap^r, 2,7 kb, *E. coli* replicon
 Vieira en Messing, Gene 19, 1982, 259-268
- pHP13 Em^r Cm^r, 4,9 kb, *E. coli* en *B. subtilis* replicons
35 Haima et al, Mol. Gen. Genet. 209, 1987, 335-342
- pMLB1034 Ap^r, 6,3 kb, *E. coli* replicon, afgeknot lacZ gen
 Silhavy et al, Experiments with gene fusions, 1984

8302 '26.

pOP190 Tc^r, 11,5 kb, *E. coli* replicon, *E. coli* asd en glgB genen

Kiel et al, Mol. Gen. Genet. 207, 1987, 294-301

pKVS1 zie eerdere beschrijving in experimenteel deel

5 pKVS2 zie eerdere beschrijving in experimenteel deel

pKVS242 zie eerdere beschrijving in experimenteel deel

pKSZ14 zie eerdere beschrijving in experimenteel deel

Medium 2 bevatte per liter 10 g casitone, 1 g gistextract, 3 g
 10 glucose, 1,5 g K₂HPO₄, 1 g KH₂PO₄, 8 g NaCl, 0,04 g CaCl₂.2H₂O,
 0,2 g MgSO₄ en 0,02 g FeCl₃.6H₂O pH 7,2. Een TY-voedingsmedium
 bevatte per liter 10 g tryptone, 5 g gistextract, 5 g NaCl en
 20 mg MnCl₂.4H₂O pH 7,4. Indien nodig, werden 0,5 % glucose,
 1,5 % agar, of 40 µg/ml XGal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-
 15 galactoside) toegevoegd. Naar behoefte werden de antibiotica
 aangevuld: voor *E. coli* Ap 100 µg/ml, Cm 10 µg/ml, Em 150 µg/ml,
 Km 50 µg/ml, en Tc 10 µg/ml; voor *B. subtilis* Cm 5 µg/ml en Em
 1 µg/ml. De media en procedures, gebruikt voor transformatie van
 competente cellen van *B. subtilis* waren zoals beschreven door
 20 Bron en Venema, Mutation Res. 15, 1972, 1-10. De restrictie-
 enzymen, T4 DNA ligase en Klenow polymerase waren afkomstig van
 Boehringer, Mannheim, BRD en ze werden volgens de voorschriften
 van de producent gebruikt. Alle andere chemicaliën waren van
 analytische kwaliteit.

25

DNA preparaten

Totaal DNA werd geïsoleerd uit *E. coli* JM101, die bij 37 °C
 op TY-voedingsmedium werd gekweekt, en uit *B. stearothermophilus*
 1503-4R var.4, die bij 55 °C werd gekweekt op TY-voedingsmedium,
 30 aangevuld met 0,5 % glucose en 0,38 g CaCl₂, zoals beschreven
 door Kiel et al, Mol. Gen. Genet. 207, 1987, 294-301. Prepara-
 tieve hoeveelheden plasmide DNA werden verkregen uit *E. coli*
 volgens de alkalische lysis procedure van Maniatis et al,
 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1982. Voor de extractie
 35 van plasmide DNA uit 2 ml cultures van *E. coli* en 5 ml cultures
 van *B. subtilis* werd de analytische "miniprep" procedure van

Ish-Horowicz en Burke, *Nucleic Acids Res.* 9, 1981, 2989-2998, gebruikt.

Procedures voor moleculaire klonering

5 Routine DNA manipulaties werden uitgevoerd zoals beschreven door Maniatis et al. DNA restrictiefragmenten werden geïsoleerd van agarosegels met NA-45 DEAE membraanfilters volgens de door de producent gegeven instructies (Schleicher und Schuell, Dassel, BRD).

10

Kruishybridisatie

Southern blot transfer werd uitgevoerd door elektroblotting van DNA restrictiefragmenten op Genescreen plus filters volgens de door de producent gegeven instructies (Dupont, NEN, Boston, 15 USA). Kolonie-blotting werd uitgevoerd op nitrocellulose filters (Schleicher und Schuell, Dassel, BRD) zoals beschreven door Maniatis et al. De filters werden ten minste 40 uur bij 58 °C of 61 °C gehybridiseerd met [α -³²P]dCTP (3000 Ci/mmol, Radiochemical Centre, Amersham, UK) gelabelde probes in 5x SSC; 1 % SDS; 20 0,02 % polyvinylpyrrolidon; 0,02 % runderserum albumine; 0,02 % ficoll 400 en 250 µg/ml kalfthymus DNA. Na hybridisatie werden de filters 3 keer bij de hybridisatietemperatuur gewassen met 5x SSC; 0,5 % SDS gedurende 1 uur. De filters werden daarna aan de lucht gedroogd en blootgegeven aan Kodak Omat films (XR-1).

25

Bepalingen van de vertakkingsenzym activiteit

Voor de detectie van plasmide-gecodeerde vertakkingsactiviteit in *E. coli* KV832 werd de complementatie analyse toegepast, die beschreven is door Kiel et al, *Gene* 78, 1989, 9-17. Voor de 30 detectie van vertakkingsactiviteit in *B. stearothermophilus*, in *E. coli* en in *B. subtilis* werd de volgende procedure gevolgd: *B. stearothermophilus* 1503-4R var.4 cellen werden in medium 2 gekweekt tot aan de vroege stationaire fase en vervolgens door centrifugeren geogst. De celpellet werd gesuspendeerd in 10 mM 35 Tris-Cl pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT (buffer A) corresponderend met een concentratie van 5 % droog gewicht, en de cellen werden met behulp van een ultrageluidsbron (MSE Ltd.) in 20 min met

pulsen van 60 sec en tussenpozen van 30 sec opengebroken. Celresten werden door centrifugeren verwijderd. Vervolgens werd fractionering met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ uitgevoerd. Het materiaal dat tussen 20 en 55 % verzadiging neersloeg werd gepelleteerd, opgelost in 5 buffer A en grondig gedialyseerd tegen dezelfde buffer. Daarna werd het extract op een DEAE-cellulose kolom (40 ml, Whatman DE 52) in buffer A gebracht. De kolom werd daarna geëlueerd met een lineaire zoutgradiënt (van 0 tot 0,675 M NaCl in buffer A). De 10 vertakkingsactiviteit elueerde bij 0,35 M NaCl en was nagenoeg vrij van amylase activiteit. Extracten uit getransformeerde *E. coli* KV832 en *B. subtilis* 5GM(amy) cellen, gekweekt op een met 0,5 % glucose aangevulde selectieve TY-voedingsbodem, werden bereid zoals door Kiel et al, Gene 78, 1989, 9-17 is beschreven. De vertakkingsactiviteit werd in deze extracten bepaald met de 15 in dezelfde publikatie beschreven procedure, die een kwantitatieve meting van α -1,6-glucosidebindingen toelaat, maar de substraat concentratie werd verhoogd tot 1,0 % amylopectine.

Nucleotidensequentie analyse

20 DNA restrictiefragmenten werden gesubkloneerd in M13mp18 en M13mp19 (Norrandar et al, Gene 26, 1983, 101-106) en getransformeerd naar *E. coli* JM101. Nucleotidensequenties werden bepaald volgens de dideoxy nucleotide keten-terminatie methode van Sanger et al, PNAS USA 74, 1977, 5463-5467, gebruikmakend van 25 het Klenow fragment van DNA polymerase I, de universele sequentie primer en [^{35}S]dATP α S (Biggin et al, PNAS USA 80, 1983, 3963-3965).

Bepaling van de β -galactosidase activiteit

30 Cellen werden een nacht bij 37 °C in 10 ml selectief TY-voedingsmedium, of met 0,5 % glucose aangevuld selectief TY-voedingsmedium gekweekt. De cultures werden vervolgens 1000-voudig verdund in 15 ml vers medium. De cellen werden dan bij 37 °C onder hevig schudden gekweekt. Elke 30-60 minuten werden 35 monsters van 0,1-1,0 ml genomen, zonodig in TY-voedingsmedium verdund, waarna de OD₆₀₀ werd bepaald. Tegelijkertijd werd een monster van 0,2 ml genomen en een nacht bij -20 °C bewaard. Na

ontdooien werden de bacteriën met chloroform en SDS permeabel
gemaakt en werd de β -galactosidase activiteit bepaald met
o-nitrofenyl- β -D-galactopyranoside als substraat volgens de
methode van Miller, 1972. De activiteiten, niet gecorrigeerd
5 voor OD₆₀₀ waarden en derhalve de activiteit per ml cultuur
voorstellend, zijn in Miller eenheden uitgedrukt.

CONCLUSIES

1. Vertakkingsenzym van microbiële oorsprong, verkregen door isolatie uit een organisme dat in staat is om het enzym tot expressie te brengen, gekenmerkt door een stabiliteit van het enzym bij temperaturen tot ten minste 50 °C en een optimum van de enzymatische activiteit bij een temperatuur boven 45 °C.
2. Vertakkingsenzym volgens conclusie 1, gekenmerkt door een afkomst van bacteriën van de soort Bacillus stearothermophilus.
3. Vertakkingsenzym volgens conclusie 1, gekenmerkt door een afkomst van bacteriën van de stam Bacillus stearothermophilus 1503-4R var.4.
4. Vertakkingsenzym volgens conclusie 1, gekenmerkt door de in fig.4 weergegeven aminozuurvolgorde
5. Vertakkingsenzym volgens conclusie 1, gekenmerkt doordat het geïsoleerd is uit bacteriën die door genetische manipulatie met behulp van een recombinant polynucleotide zijn voorzien van genetische informatie, die nodig is om het enzym tot expressie te kunnen brengen.
6. Werkwijze voor het modificeren van een zetmeelachtig materiaal door het te behandelen met een vertakkingsenzym van microbiële oorsprong, verkregen door isolatie uit een organisme dat in staat is om het enzym tot expressie te brengen, met het kenmerk, dat een vertakkingsenzym volgens een van de conclusies 1-5 wordt toegepast.
7. Gemodificeerd zetmeelachtig materiaal, verkregen onder toepassing van de werkwijze volgens conclusie 6.
8. Werkwijze voor het bereiden of vervaardigen van een voor consumptie door mens of dier geschikt produkt, welk produkt een zetmeelachtig materiaal omvat, dat door behandeling met een vertakkingsenzym van microbiële oorsprong is gemodificeerd, met het kenmerk, dat voor de modificatie van het zetmeelachtige materiaal een vertakkingsenzym volgens een van de conclusies 1-5 wordt toegepast.

501126

9. Voor consumptie door mens of dier geschikt produkt, verkregen onder toepassing van de werkwijze volgens conclusie 8.
10. Recombinant polynucleotide, in het bijzonder recombinant DNA, met het kenmerk, dat het genetische informatie bevat welke codeert voor een vertakkingsenzym volgens een van de conclusies 1-5.
11. Recombinant polynucleotide volgens conclusie 10, met het kenmerk, dat het de in figuur 4 weergegeven, voor vertakkingsenzym van bacteriën van de stam Bacillus stearothermophilus 1503-4R var.4 coderende nucleotidenvolgorde omvat.
12. Recombinant polynucleotide volgens conclusie 10 of 11, met het kenmerk, dat het bovendien een transcriptiepromoter en eventueel andere regulatie-elementen omvat.
13. Chimeer plasmide, omvattende een vectorplasmide met daarin een insertie van DNA, die een transcriptiepromoter en eventueel andere regulatie-elementen omvat, met het kenmerk, dat de DNA insertie tevens DNA omvat dat codeert voor een vertakkingsenzym volgens een van de conclusies 1-5.
14. Chimeer plasmide volgens conclusie 13, met het kenmerk, dat de DNA insertie de in fig.4 weergegeven, voor vertakkingsenzym van bacteriën van de stam Bacillus stearothermophilus 1503-4R var.4 coderende nucleotidenvolgorde omvat.

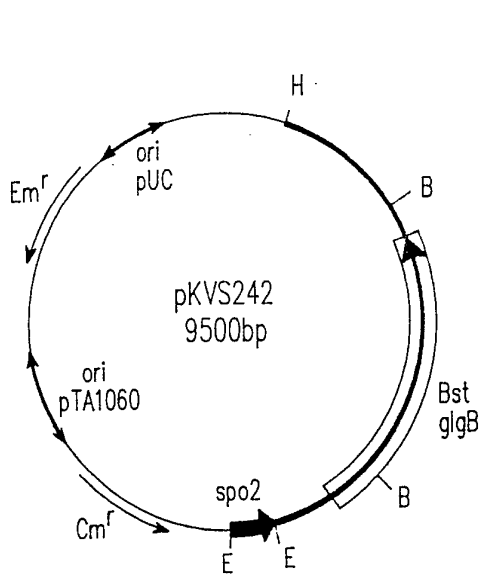


FIG.1

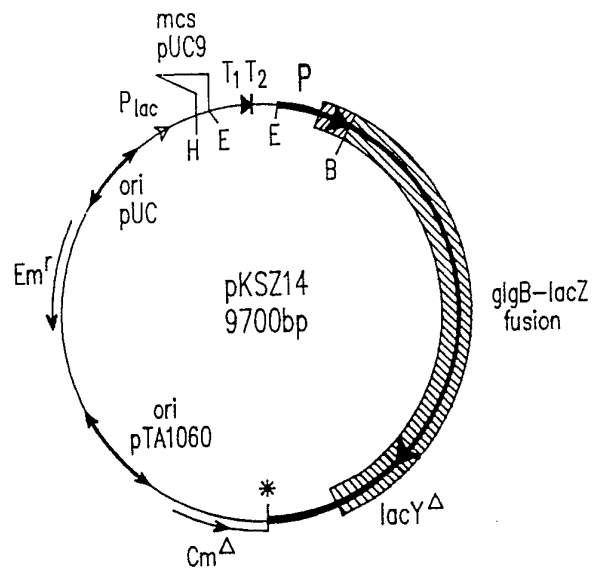


FIG.2

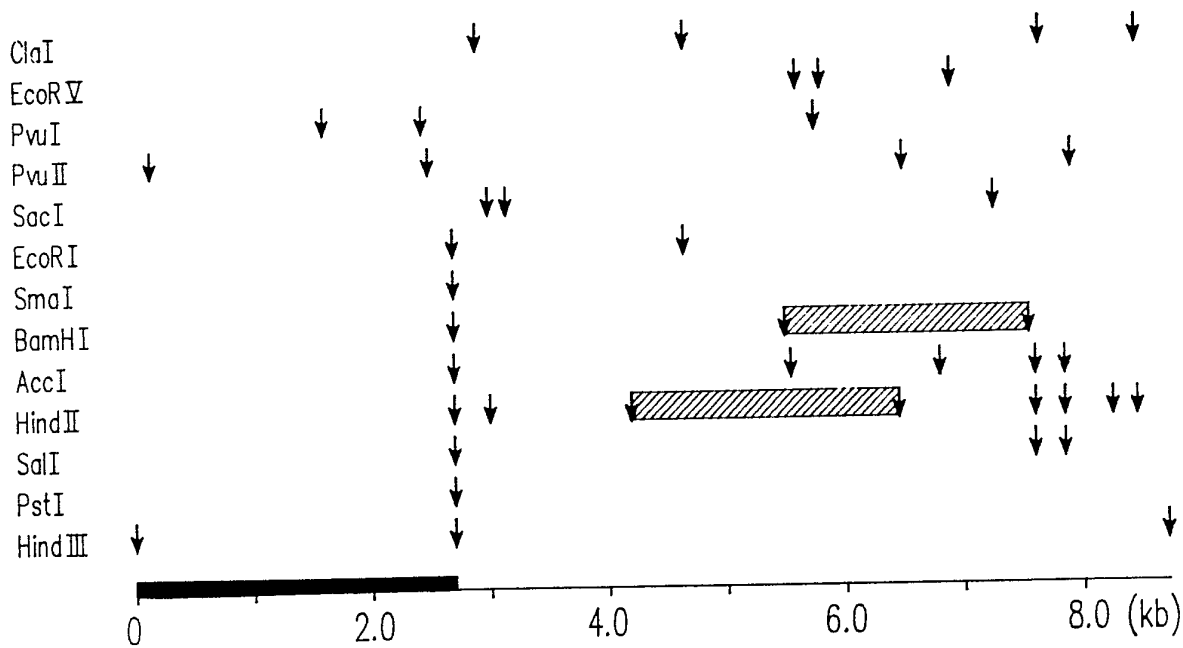


FIG.3

1
 30 60 90 120
 GAATTCJAATGGAATAATGGCTAACGTAAGGCCGTTTAAAAAGGACGTAATAATTTCAAAGCGCAAATAACCGAATGTAATCGATGATTGGCGGACCCATGGCAAGATAAAGACCGA
 150 180 210 240
 TCATGCTAAGCCCAAGCCCAATACGTCAGATGCCATATGGGACAGTCGGAAAGCAAAGCTAAGGAATTGGATAATAGCCCCCAACAATTTCCACAATCGTAAAAAACAATGTTAAAA
 270 300 330 360
 CGAGAGTGATCCAAAGCGTTTTTTTCGATTGATTTTGGTTTTTACATGAGGAAGATGGTGAATAATCGTATTGAATTGGTACATGACACACCTCTTATTAGAAATTATTTTAAATTTAT
 390 420 450 480
 ATACATTATAATAGTTTTTTTATAATGTCGCAAAAAAATTTTTGTTTATTTATCGAAAAATGTAAAAAAATAACAATTTTTTTATCAAGGAATTTATGGAATCGCTGGGAATATAAG
 TAAATAT ——— FORP2 ——— CACGTT
 510 540 570
 TAACAACGGTAAAGAACTTTAAGGAAAGGATGGATACAGA TTG ATC GCC GTC GGT 540 CCC ACT GAT TTA GAA ATC TAT TTA TTT CAT GAA GGC AGC TTA
 Met Ile Ala Val Gly Pro Thr Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Phe His Glu Gly Ser Leu
 600 630 660
 TAT AAA AGT TAT GAA TTG TTT GGT GCA CAT GTG ATA AAG AAA AAT GGC ATG GTC GGA ACC CGG TTT TGT GTA TGG GCA CCC CAT GCG CGG
 Tyr Lys Ser Tyr Glu Leu Phe Gly Ala His Val Ile Lys Lys Asn Gly Met Val Gly Thr Arg Phe Cys Val Trp Ala Pro His Ala Arg
 690 720 750
 GAA GTG CGA TTA GTC GGC AGT TTT AAT GAA TGG AAC GGA ACT AAT TTT AAC CTT ATG AAA GTA AGT AAT CAA GGC GTA TGG ATG ATT TTT
 Glu Val Arg Leu Val Gly Ser Phe Asn Glu Trp Asn Gly Thr Asn Phe Asn Leu Met Lys Val Ser Asn Gln Gly Val Trp Met Ile Phe
 780 810 840
 ATT CCT GAA AAC TTA GAA GGG CAT TTA TAT AAA TAC GAA ATT ACG ACC AAC GAT GAT GGG AAT GTT CTG TTA AAA TGG GAT CCA TAC GCG TTT
 Ile Pro Glu Asn Leu Glu Gly His Leu Tyr Lys Tyr Glu Ile Thr Thr Asn Asp Gly Asn Val Leu Leu Lys Ser Asp Pro Tyr Ala Phe
 870 900 930
 TAC TCC GAG TTG CGT CCC CAT ACT GCT TCC ATT GTC TAC AAC ATA AAA GGA TAT CAA TGG AAT GAC CAG ACA TGG CGA CGG AAG AAA CAG
 Tyr Ser Glu Leu Arg Pro His Thr Ala Ser Ile Val Tyr Asn Ile Lys Gly Tyr Gln Trp Asn Asp Gln Thr Trp Arg Arg Lys Lys Gln
 960 990 1020
 CGA AAG CGA ATT TAT GAC CAG CCT TTG TTC ATT TAT GAA CTT CAC TTT GGT TCG TGG AAA AAG AAA GAG GAC GGC AGT TTT TAT ACA TAT
 Arg Lys Arg Ile Tyr Asp Gln Pro Leu Phe Ile Tyr Glu Leu His Phe Gly Ser Trp Lys Lys Lys Glu Asp Gly Ser Phe Tyr Thr Tyr
 1050 1080 1110
 CAA GAG ATG GCA GAG GAG CTA ATC CCT TAT GTT CTC GAA CAT GGG TTT ACT CAT ATT GAG CTG CTC CCA CTC GTC GAG CAT CCG TTC GAT
 Gln Glu Met Ala Glu Glu Leu Ile Pro Tyr Val Leu Glu His Gly Phe Thr His Ile Glu Leu Leu Pro Leu Val Glu His Pro Phe Asp
 1140 1170 1200
 CGT TCT TGG GGA TAT CAG GGA ATA GGT TAT TAT TCA GCA ACA AGC CGC TAC GGA ACA CCG CAT GAT TTG ATG TAT TTT ATT GAC CGC TGT
 Arg Ser Trp Gly Tyr Gln Gly Ile Gly Tyr Tyr Ser Ala Thr Ser Arg Tyr Gly Thr Pro His Asp Leu Met Tyr Phe Ile Asp Arg Cys
 1230 1260 1290
 CAC CAA GCT GGA ATA GGC GTC ATT CTC GAT TGG GTT CCT GGC CAC TTT TGT AAA GAT TCC CAT GGG TTA TAT ATG TTT GAT GGC GCA CCG
 His Gln Ala Gly Ile Gly Val Ile Leu Asp Trp Val Pro Gly His Phe Cys Lys Asp Ser His Gly Leu Tyr Met Phe Asp Gly Ala Cys
 1320 1350 1380
 GCA TAT GAA TAT GCC AAC ATG CAA GAC CGG GAA AAT TAC GTA TGG GGA ACG GCA AAC TTT GAC CTT GGC AAG CCG GAA GTC CGC AGC TTT
 Ala Tyr Glu Tyr Ala Asn Met Gln Asp Arg Glu Asn Tyr Val Trp Gly Thr Ala Asn Phe Asp Leu Gly Lys Pro Glu Val Arg Ser Phe
 1410 1440 1470
 TTG ATT TCC AAT GCG TTA TTT TGG ATG GAA TAT TTC CAT GTG GAC GGG TTT CGT GTA GAT GCT GTT GCC AAT ATG TTA TAT TGG CCA AAC
 Leu Ile Ser Asn Ala Leu Phe Trp Met Glu Tyr Phe His Val Asp Gly Phe Arg Val Asp Ala Val Ala Asn Met Leu Tyr Trp Pro Asn
 1500 1530 1560
 AGC GAC GTA CTA TAC AAA AAT ACG TAT GCC GTG GAG TTC TTG CAA AAA TTA AAT GAA ACG GTA TTC GCC TAT GAT CCG AAC ATA TTA ATG
 Ser Asp Val Leu Tyr Lys Asn Thr Tyr Ala Val Glu Phe Leu Gln Lys Leu Asn Glu Thr Val Phe Ala Tyr Asp Pro Asn Ile Leu Met
 1590 1620 1650
 ATT GCC GAA GAT TCG ACA GAC TGG CCG CGC GTC ACT GCT CCA ACA TAC GAC GGA GGA TTA GGA TTT AAC TAT AAA TGG AAC ATG GGA TGG
 Ile Ala Glu Asp Ser Thr Asp Trp Pro Arg Val Thr Ala Pro Thr Tyr Asp Gly Gly Leu Gly Phe Asn Tyr Lys Trp Asn Met Gly Trp
 1680 1710 1740
 ATG AAC GAT ATT TTA ACT TAT ATG GAA ACG CCG CCT GAA CAT CGA AAA TAC GTG CAC AAT AAA GTA ACA TTT TCC CTC TTG TAT GCG TAT
 Met Asn Asp Ile Leu Thr Tyr Met Glu Thr Pro Pro Glu His Arg Lys Tyr Val His Asn Lys Val Thr Phe Ser Leu Leu Tyr Ala Tyr
 1770 1800 1830
 TCG GAA AAT TTC ATT TTA CCT TTT TCC CAT GAC GAG GTC GTA CAT GGA AAA AAA TCG CTG TTA AGT AAA ATG CCG GGC ACA TAT GAG GAA
 Ser Glu Asn Phe Ile Leu Pro Phe Ser His Asp Glu Val Val His Gly Lys Lys Ser Leu Leu Ser Lys Met Pro Gly Thr Tyr Glu Glu
 1860 1890 1920
 AAG TTT GCG CAA TTA AGG TTG CTG TAT GGA TAT TTG TTG ACG CAT CCT GGT AAG AAA TTA TTG TTT ATG GGC GGC GAA TTT GCG CAG TTT
 Lys Phe Ala Gln Leu Arg Leu Leu Tyr Gly Tyr Leu Leu Thr His Pro Gly Lys Lys Leu Leu Phe Met Gly Gly Glu Phe Gly Gln Phe
 1950 1980 2010
 GAT GAA TGG AAA GAT TTA GAG CAG CTG GAT TGG ATG CTT TTT GAT TTT GAT ATG CAT CCG AAT ATG AAT ATG TAT GTG AAA GAA TTG TTG
 Asp Glu Trp Lys Asp Leu Glu Gln Leu Asp Trp Met Leu Phe Asp Phe Asp Met His Arg Asn Met Asn Met Tyr Val Lys Glu Leu Leu
 2040 2070 2100
 AAA TGT TAT AAG CGC TAT AAA CCG CTT TAT GAG TTA GAC CAC TCT CCA GAT GGA TTC GAG TGG ATT GAT GTT CAT AAC GCC GAA CAA AGT
 Lys Cys Tyr Lys Arg Tyr Lys Pro Leu Tyr Glu Leu Asp His Ser Pro Ser Asp Gly Phe Glu Trp Ile Asp Val His Asn Ala Glu Gln Ser
 2130 2160 2190
 ATT TTC TCA TTC ATT CGC AGA GGA AAA AAA GAG GAT GAT TTG CTT ATT GTT GTG TGT AAT TTC ACA AAT AAA GTA TAC CAC GGT TAT AAA
 Ile Phe Ser Phe Ile Arg Arg Gly Lys Lys Glu Asp Asp Leu Leu Ile Val Val Cys Asn Phe Thr Asn Lys Val Tyr His Gly Tyr Lys
 2220 2250 2280
 GTT GGT GTT CCG TTA TTT ACA AIA TAT CCG GAA TTA ATC AAT AGC GAT TCA ATC CAA TTC GGC GGC TTT GGG AAT ATC AAT CCA AAA CCG
 Val Gly Val Pro Leu Phe Thr Arg Tyr Arg Glu Val Ile Asn Ser Asp Ala Ile Gln Phe Gly Gly Phe Gly Asp Ile Asn Pro Lys Pro
 2310 2340 2370
 ATT GCG GCG ATG GAA GGG CCG TTT CAC GGA AAG CCA TAT CAT ATT CAG ATG ACG ATC CCG CCG TTT GGC ATT TCT ATT TTA AGA CCA GTA
 Ile Ala Ala Met Glu Gly Pro Phe His Gly Lys Pro Tyr His Ile Gln Met Thr Ile Pro Pro Phe Gly Ile Ser Ile Leu Arg Pro Val
 2400 2430 2460
 AAA AAA GGT AGC GTC AAA AGT TTT ATG AAA ACT CCA CAT CCG CCA TCC CAT GGA GCA TCG TAA GGCATCTTGGAGCCGGATTGCCCTTGACCAACA
 Lys Lys Glu Ser Lys Ser Phe Met Lys Thr Pro His Pro Pro Ser His Gly Ala Ser End
 2490 2520 2550 2580
 CCCGCCAAGGTGTGAAGGGACGTCAGAGGGCGACGGGACAAAAAGAGGGCATAGAAAGCCGCTTCCCTTACCGAATTTTACCTTTGACGAGGTTGGTCAAGGGTTCCG
 2610 2640 2670 2700
 TTCGCCGAATCCGCGTCTCTCTGATCCATGGGCTCCGCTGGGACAAAAAGTTAGGCTGCCCTTTGTTGGAGGAATCTTGAGCCATGGCGATCAGCTTCCTCCACCGGGCCGGCATAT

FIG 4

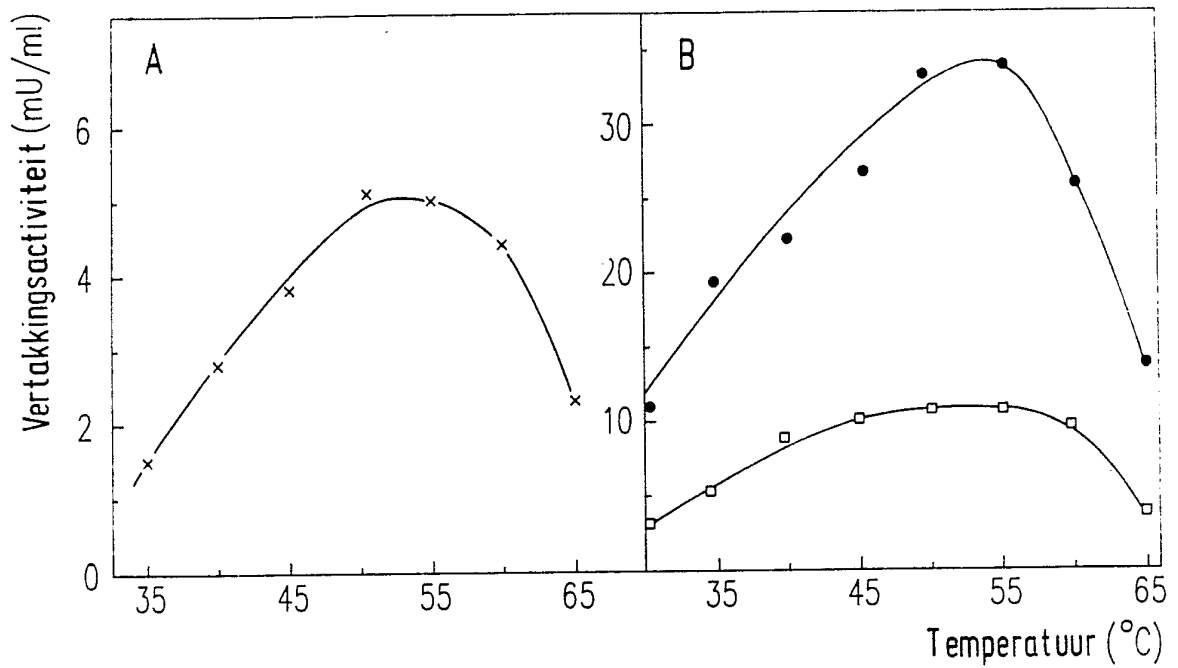


FIG.5

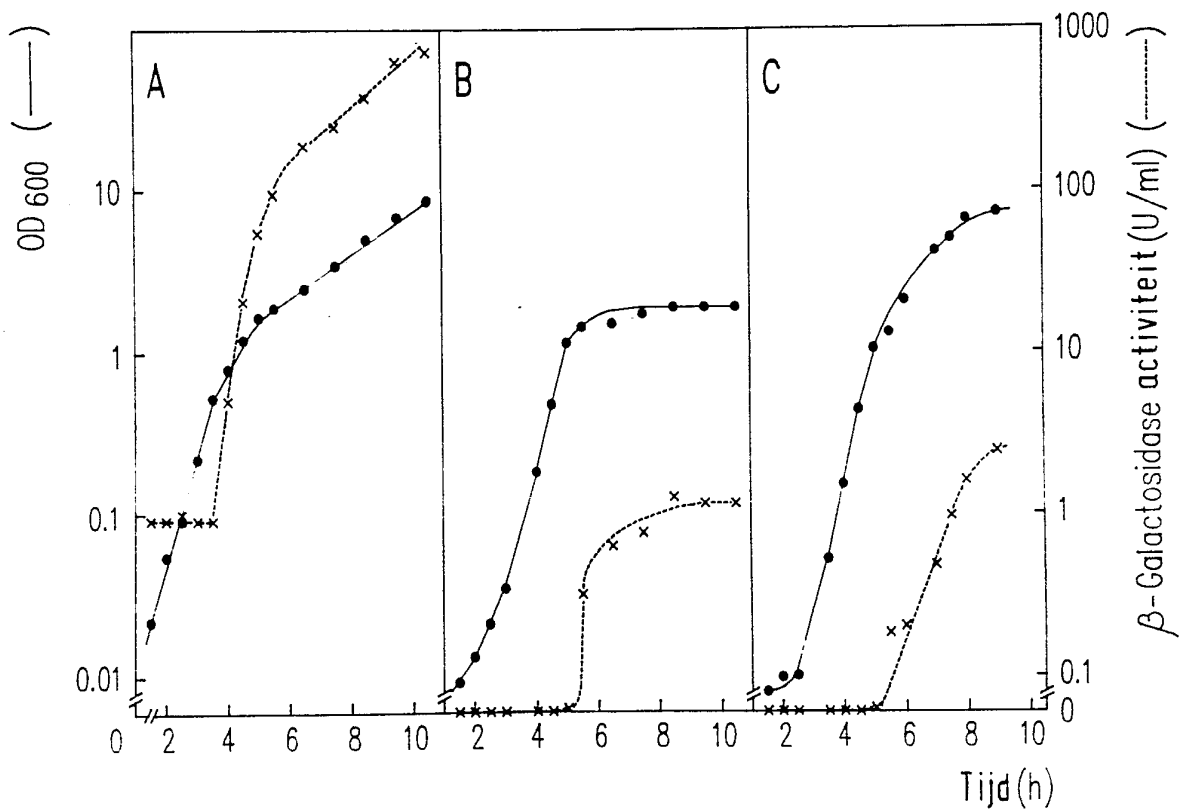


FIG.6