

Award Address: Distinguished Young Scientist Award of the 2004's JSAG

An Oxidation Stable and Chelator-resistant, Calcium-free α -Amylase from the Alkaliphilic *Bacillus* Isolate KSM-K38

(Received September 16, 2004 ; Accepted October 8, 2004)

Hiroshi Hagihara*

Biological Science Laboratories, Kao Corporation (2606, Akabane, Ichikai, Haga, Tochigi 321–3497, Japan)

Abstract: We found a novel α -amylase (AmyK38) in a culture of a novel, alkaliphilic *Bacillus* sp. strain KSM-K38. The enzyme was an alkaline, liquefying α -amylase, having a pH optimum of 8.0–9.5, and exhibiting strong resistance to chemical oxidants and chelating reagents. Therefore, the enzymatic properties of AmyK 38 fulfill the essential requirements for enzymes that can be used as effective additives in detergents. To further characterize and understand the unique features of AmyK38, we cloned and sequenced the gene for the enzyme. The amino acid sequence of the mature enzyme showed moderate homology with those of liquefying α -amylases from the genus *Bacillus*. By building a molecular model, we concluded that the high oxidative stability of AmyK38 was because the amino acid residue corresponding to Met197 in BLA is replaced by non-oxidizable Leu. We also suggested that the loss of coordination geometries of the Ca in AmyK 38 reflects its high resistance to chelating reagents. The previously reported α -amylases all contain one or more calcium per protein molecule. Surprisingly, AmyK38 was found to contain no Ca. Thus, this is the first report of calcium-free α -amylase. Additionally, AmyK38 required monovalent cations for manifestation of activity. Furthermore, we have determined the crystal structure of AmyK38, which revealed that sodium ions, instead of calcium ions, are used to retain the structure and function of this α -amylase. To make AmyK38 industrially useful, we improved the thermostability of this enzyme by protein engineering without any changes in the enzymatic properties.

Key words: calcium-free, α -amylase, *Bacillus*, oxidative stability, chelator resistance

酸化剤耐性とキレート剤耐性を有し、カルシウムを含まない α -アミラーゼに関する研究**

萩原 浩*

花王株式会社生物科学研究所 (321–3497 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2606)

α -アミラーゼ (EC 3.2.1.1) は古くから醸造工業をはじめ、澱粉工業、食品工業、繊維工業、洗剤工業など多くの産業で利用されている¹⁻⁴⁾。このうち洗剤においては、衣類や食器類に付着した澱粉系汚れを除去する目的で、1970年初期より *Bacillus* 属細菌由来の液化型 α -アミラーゼが利用されている⁵⁾。洗剤に使用されている液化型 α -アミラーゼで最も需要の大きいのは、*Bacillus licheniformis* が生産する耐熱性の中酸性酵素 (BLA)⁶⁾である。BLAが洗剤用酵素として広く使用されているのは、アルカリ領域でも活性を有し、キレート剤に対しても比較的安定なためである。しかしながら、BLAの最適作用 pH は 6.5 付近であるため、pH 8–11 で使用される洗剤にはこの領域で最適作用を示すアルカリ液化型 α -アミラーゼが望まれていた^{4,7)}。近年、筆者の研究室で、最適作用 pH を 8.0–8.5 に有するアルカリ液化型 α -アミラーゼ (AmyK ; 以前は LAMY と記載) を好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌 KSM-1378 株の培養液から見出した⁸⁾。BLA と比べると比活性は約 5 倍も高く、

工業生産の面でも有利な酵素であった。しかし、自動食器洗浄機は最終的に洗浄温度が 50–60°C に上昇するため、その専用洗剤 (ADD ; automatic dishwashing detergents) への配合には熱安定性の向上が望まれた。蛋白質工学的手法により 181 位のアルギニン残基と 182 位のグリシン残基を欠失させた結果、熱安定性は飛躍的に増大した⁹⁾。同時にキレート剤耐性も増加したが、その耐性度はまだ BLA より低かった (未発表データ)。

また、 α -アミラーゼは酵素構造を維持するため分子内にカルシウムを保持している^{10,11)}。したがって、洗剤配合必須成分であり、洗浄水中のカルシウムなどを捕獲し洗浄力を高めるキレート剤との共存下では、その安定性が低下することが知られていた。比較的安定な BLA でさえも、完全には安定でない。さらに近年、洗濯と同時に漂白してシミ汚れを除去する目的で、洗剤に酸化漂白剤が配合されるようになった¹²⁾。 α -アミラーゼは酸化剤に対して不安定であるため、蛋白質工学による改良が試みられた。ノボザイムズ社ではターマミル[®] (ノボザイムズ社製 BLA) 分子中の 197 位のメチオニン残基をロイシン残基に置換した酸化安定化変異酵素をデュラミル[®]として 1996 年に市場に投

* Tel. + 81-285-68-7530, Fax. + 81-285-68-7566, E-mail: hagihara.hiroshi@kao.co.jp

** 平成 16 年度日本応用糖質学会奨励賞受賞講演

入した¹³⁾. 筆者の研究室でも, BLA の 197 位に相当する AmyK の 202 位のメチオニン残基を非酸化性のアミノ酸残基に置換するだけで, 強烈的な酸化剤耐性を獲得することを見出している¹⁴⁾.

しかしながら現在まで, アルカリ条件下で高い活性, 安定性を示し, さらに酸化剤やキレート剤に対しても非常に安定な液化型 α -アミラーゼの報告例は全くない. そこで, 筆者の研究室では, 配合酵素にとって極限環境条件である洗剤に適したハイパフォーマンスな α -アミラーゼの探索を行った. その結果, 新規酵素 AmyK38 を発見するに至った¹⁵⁾. 本稿では, AmyK38 の優れた酵素特性を紹介するとともに, シーケンスとモデリングより明らかにした酸化剤耐性とキレート剤耐性の機構, AmyK38 における金属イオンの役割, 結晶構造解析および高機能化に向けた蛋白質工学による耐熱化について概説する.

1. AmyK38 生産菌

新規酵素 AmyK38 生産菌は, 着色澱粉を練り込み, pH をアルカリに調整した寒天平板培地上で, 周辺にハローを形成するコロニーとして土壌サンプルより分離した菌株のなかで, その培養上清液に酸化剤とキレート剤耐性能を有する菌株として選抜された. 本菌株は, 生理学的および生化学的性質より好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌であることがわかり, さらに, 16S rDNA 間の類似性, 発生系統学的解析 (Fig. 1), DNA-DNA ハイブリダイゼーションレベルならびに GC 含量より, 新種 *Bacillus* 属細菌と判断した. そこで, 本菌株を好アルカリ性 *Bacillus* sp. KSM-K38 株と命名した.

2. AmyK38 の酵素特性

まず, KSM-K38 株の培養液から AmyK38 を電気泳動的に単一になるまで精製して, 物理化学的および酵素化学的特性を解析した. その結果, AmyK38 は洗剤配合に要求される特性を全て充足したハイパフォーマンスな酵素であることが判明した. 活性の最適作用 pH は AmyK と同様アルカリ側に有しており (pH 8.0–9.5), また, pH 10 での比活性は BLA の約 6 倍も高く (Fig. 2), 安価な大量消費財である洗剤への配合において, 製造やコスト面でのメリットも伺われた. 分子量 (55 kDa) や反応様式 (洗剤配合に適した液化型) は BLA や AmyK とほぼ同様であったが, 以下に示すように, 酸化剤とキレート剤に対する安定性は明らかに異なっていた.

AmyK38 は, BLA が急激に失活する 0.6 M H₂O₂ 中でも十分な活性を維持した (Fig. 3). さらに, 1.8 M と非常に高濃度の H₂O₂ 中 60 分間処理後でも, 80% 以上の残存活性を示したことより, AmyK38 は天然型 α -アミラーゼとしては初めての酸化安定な酵素と考えている. 同様に, キレート剤に対しても非常に安定な酵素であることがわかった. AmyK38 は 1 mM EDTA 存在下でも充分活性を維持したのに対して, 比較的安定といわれている BLA は時間と

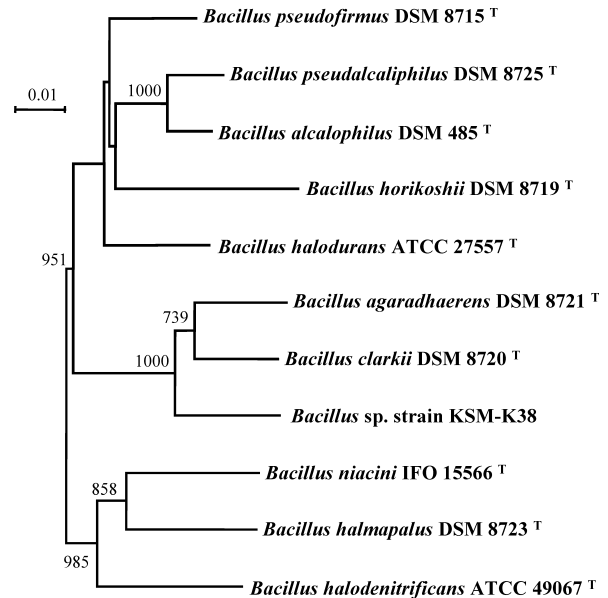


Fig. 1. Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequences of strain KSM-K38 and representative *Bacillus* strains.

A phylogenetic tree was inferred by the neighbor-joining method in the Clustal X program ver. 1.64 b. The numbers at internal nodes are bootstrap values above 500 derived from 1000 samples in which the group to the right of the node was monophyletic. Bootstrap probability values less than 50% were omitted from the figure. Sequences incorporated in the figure are under the following accession numbers; *Bacillus* sp. strain KSM-K38, AB044748; *Bacillus agaradhaerens* DSM 8721^T, X76445; *Bacillus clarkii* DSM 8720^T, X76444; *Bacillus alcalophilus* DSM 485^T, X76436; *Bacillus pseudofirmus* DSM 8715^T, X76439; *Bacillus pseudocaliphilus* DSM 8725^T, X76449; *Bacillus halodurans* ATCC 27557^T, AB021187; *Bacillus halodenitrificans* ATCC 49067^T, AB021186; *Bacillus horikoshii* DSM 8719^T, X76443; *Bacillus halmapalus* DSM 8723^T, X76447; and *Bacillus niacini* IFO 15566^T, AB021194. Bar = 0.01 *K*_{nuc} unit.

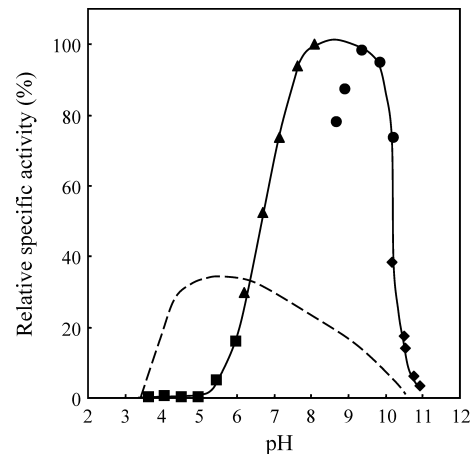


Fig. 2. Effect of pH on the activities of AmyK38 and BLA.

The pH-activity curves of purified AmyK38 and BLA (each at 0.2 U/mL) are shown. The buffers used (50 mM each) were as follows: acetate, pH 3.5–6.0 (■); potassium phosphate, pH 6.0–8.0 (▲); glycine-NaOH, pH 9.0–10.5 (●); carbonate, pH 10.0–12.0 (◆). The dotted line shows the results with BLA as reference. The values are shown as percentages of the maximum specific activity of AmyK38, which is taken as 100%.

共に失活が認められた (Fig. 4). さらに驚くべきことに, 100 mM と非常に高濃度の EDTA や EGTA 存在下でも AmyK38 は非常に安定であった (Fig. 5). 通常, キレート

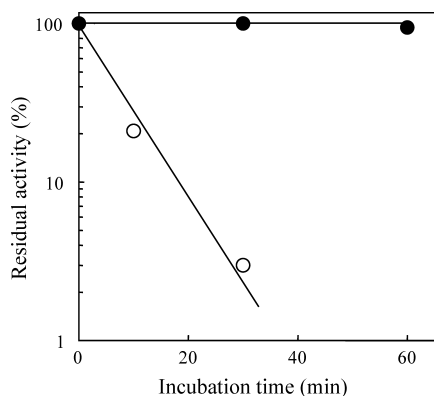


Fig. 3. Courses of the inactivation by H₂O₂ of AmyK38 (●) and BLA (○).

Each enzyme (2.0 U/mL) was incubated in the presence of 0.6 M H₂O₂ at pH 10 in 50 mM glycine-NaOH buffer and at 30°C for up to 60 min. Samples (0.2 mL) were taken at the indicated intervals and immediately added to a solution of catalase (200 μ g/mL) to quench remaining H₂O₂. The solution (0.1 mL) was used for the measurement of the residual activity. The values are shown as percentages of the original activity, which is taken as 100%.

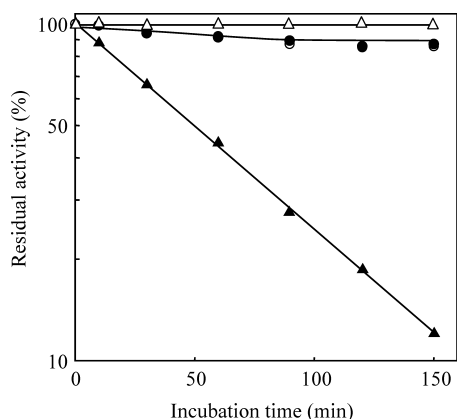


Fig. 4. Effect of EDTA on the activities of AmyK38 and BLA.

The stability of AmyK38 (circle symbols) and BLA (triangle symbols) against 1 mM EDTA (●, ▲) was compared with each control (without EDTA: ○, △) after incubation at pH 10 in 50 mM glycine-NaOH buffer and at 40°C for up to 150 min. Samples (0.1 mL) were taken after the indicated times, and then the residual activity in the sample was immediately measured. The values shown are percentages of the respective original activities, which are taken as 100%.

剤処理を過酷にすると強固に結合したカルシウムも酵素分子より剥離され、その結果、 α -アミラーゼは活性な構造を維持できなくなる。

3. 構造活性相関

AmyK38 の酸化剤耐性と高度なキレート剤耐性の機構を明らかにするため、まず、AmyK38 遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定した¹⁶⁾。AmyK38 の推定アミノ酸配列は他の液化型 α -アミラーゼと約 60% の相同性を示し、その配列中には、澱粉関連酵素に広く共通な、活性中心を形成する四つの保存領域が存在した¹⁷⁾。また、その構造は BLA と同様に、A, B, C の三つのドメインからなり、主ドメイン A は (β/α)₈ バレル構造をとると考えられた (Fig. 6)。

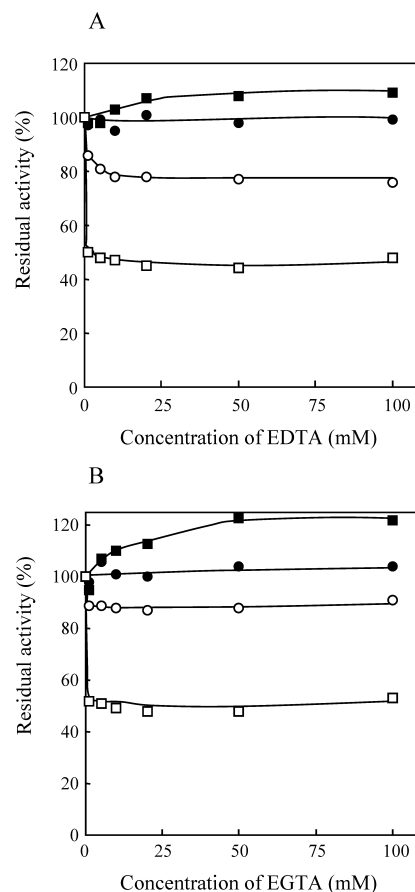


Fig. 5. Effects of graded concentrations of EDTA (A) or EGTA (B) on the activity of AmyK38 and BLA.

(A) Both enzymes (each at 2.0 U/mL) were incubated at pH 10 in 50 mM glycine-NaOH buffer in the presence of the indicated concentrations of EDTA at both 30°C (AmyK38, ●; BLA, ○) and 45°C (AmyK38, ■; BLA, □). Samples (0.1 mL) were taken after a 30-min incubation, and then the residual activities in the samples were immediately measured. The values shown are percentages of the respective original activities, which are taken as 100%. (B) AmyK38 and BLA (each at 2.0 U/mL) were each treated with EGTA under the same conditions described above.

次に、BLA の結晶構造¹⁸⁾を鋳型にして AmyK38 の分子モデルを構築した。AmyK38 のモデル構造を BLA と活性中心領域で比較してみると、BLA の 197 位メチオニン残基に相当するアミノ酸残基はロイシンであった (Fig. 7)。BSA, BAA, AmyK 中にも完全に保存されている BLA の 197 位メチオニン残基 (Fig. 6 参照) は基質結合に関与し、化学的酸化を受けやすいことが報告されている^{12,18)}。よって、AmyK38 の優れた酸化安定性は BLA の 197 位メチオニン残基に相当するアミノ酸残基が非酸化性のロイシンであることによると結論した。

AmyK38 は強力なキレート剤耐性を有することより、カルシウム結合領域周辺の微細構造が既知の α -アミラーゼとは異なる予想された。そこで、BLA のカルシウム結合領域とそれに相当する AmyK38 のモデル構造を比較した (Fig. 8)。BLA では、ドメイン A と B 中のアミノ酸 10 残基が CaI-Na-CaII の金属トライアード形成に関与している。しかしながら、AmyK38 では、この 10 残基のうち 4 残基が結合に必要なカルボキシル側鎖をもたないアミノ酸

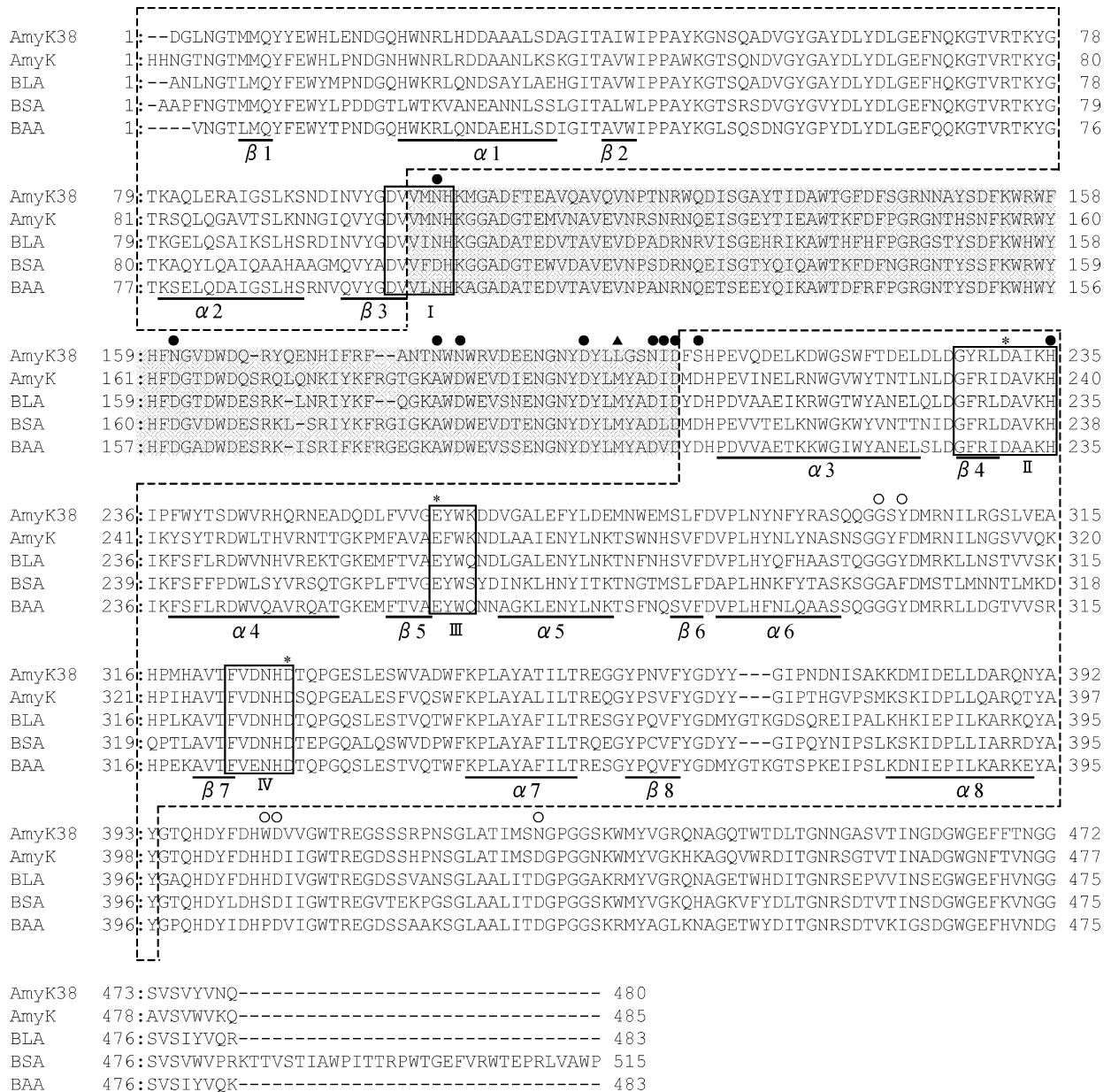


Fig. 6. Amino acid sequence alignment of AmyK38 and other *Bacillus* amylases.

Each numbering starts after the respective signal peptide. Domains A and B are indicated by dotted boxes and shading, respectively, and the remaining C-terminal region is domain C. Locations of α -helices ($\alpha 1$ - $\alpha 8$) and β -sheets ($\beta 1$ - $\beta 8$) in the crystal structure of BLA are shown under the sequences. In the case of BLA, the amino acid residues shown by closed circles are involved in the CaI-Na-CaII metal triad, and those shown by open circles are in the CaIII binding site at the interface between domains A and C. The Met residue indicated by closed triangle is primarily attacked by chemical oxidation. The asterisks above the sequences indicate the catalytic residues of α -amylases. Sequence accession numbers were as follows: AmyK38, AB051102; AmyK, AB008763; BLA, P06278; BSA, P06279; and BAA, P00692.

残基で置換されており、金属トライアド形成は困難と予想された。また、BLA中のCaIIIは五つのアミノ酸残基で配位されているが、AmyK38では、このうち2残基がトリプトファン残基とアスパラギン残基で置換されていた。したがって、この領域でもAmyK38はカルシウムを安定に取り込める環境をもっていないと考えられた。以上より、カルシウムとの配位結合の欠落がAmyK38の高度なキレート剤耐性の主要因と推定した。

4. 金属イオンの役割

上記の推定を立証するため、AmyK38分子中の金属イオンをICPにより分析した。その結果、モデル構造から予

想されたとおり、AmyK38はカルシウムを含まないことが明らかとなった (Table 1)。これまで報告されている α -アミラーゼの中で唯一、AmyK38と同様、カルシウムとの結合に参与するアミノ酸残基の保存性が低く、活性発現にカルシウムを必要としない超好熱始原菌由来の α -アミラーゼ¹⁹⁻²¹⁾において、少なくとも二つのカルシウムが分子内に保持されていることが最近になって報告された²²⁾。したがって、AmyK38は世界に先駆けた、カルシウムを含まない α -アミラーゼの初めての報告といえる。

さらに、AmyK38分子における金属イオンの役割を調べるため、活性や熱安定性に及ぼす金属イオンの影響を解析した。その結果、AmyK38は活性発現にナトリウム (ある

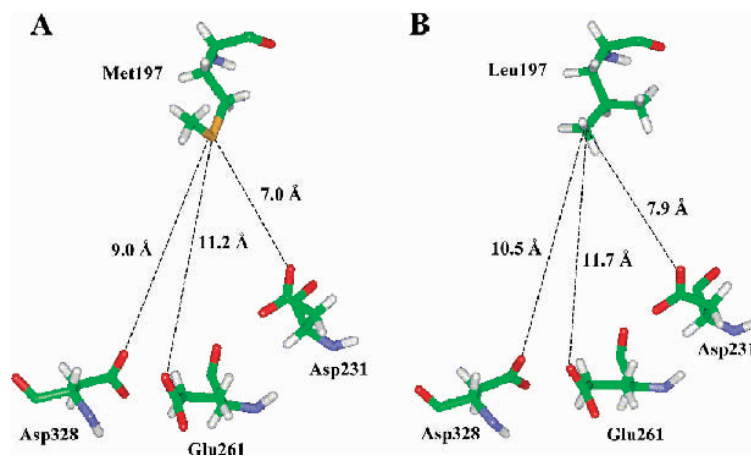


Fig. 7. Comparison of the crystal structure of BLA (A) and the model structure of AmyK38 (B) around the active site.

The figures are stick models showing the distance from the respective catalytic residues to Met197 in BLA and Leu197 in AmyK38, with oxygen atoms in red, nitrogen atoms in purple, carbon atoms in green, and hydrogen atoms in white.

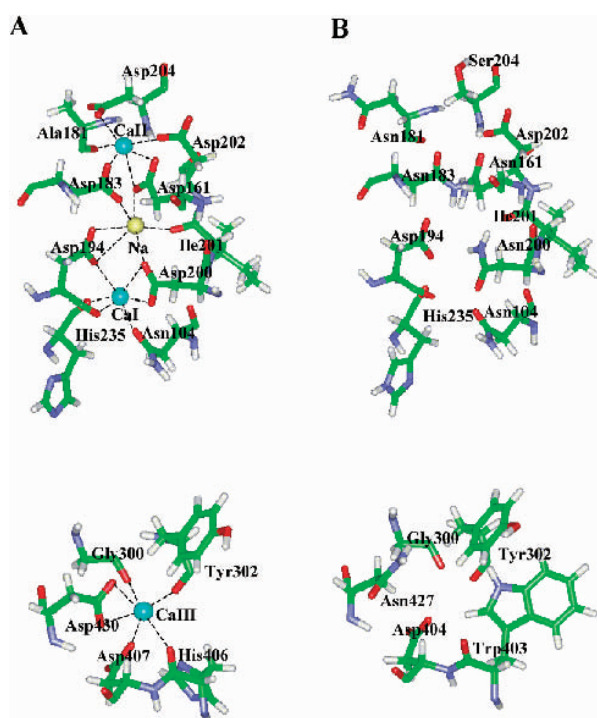


Fig. 8. Detailed views of the coordination geometry of the Ca^{2+} ions in the crystal structure of BLA (A) and the corresponding region of the model structure of AmyK38 (B).

The Ca^{2+} ions are shown in blue and the Na^{+} ion is in yellow. The interaction with water is omitted from the figure. Upper, the CaI and CaII ions in the triadic Ca-Na-Ca metal-binding site; lower, the CaIII ion at the interface between domains A and C in the crystal structure of BLA.

いはカリウム、リチウム)を要求することが明らかとなった (Fig. 9). カルシウムは活性発現に必要ななかった。しかし、これら一価カチオンやカルシウムのいずれにも、熱失活に対する保護効果は認められなかった。以上より、AmyK38の活性発現や構造維持機構は、カルシウムを必要とする従来の α -アミラーゼとは明らかに異なることが予想された。

5. 結晶構造解析

最近、野中らにより AmyK38 の X 線結晶構造解析が報

Table 1. Metal concentration and enzymatic activity of AmyK38 after dialysis.

Metal	Dialysis at pH 10	Dialysis at pH 4.5	Dialysis versus EDTA
	(4678)	(4434)	(4595)
Ca	0.05, 0.17	0.10	0.01, 0.00
Mg	0.14, 0.04	0.03	0.00
Mn	0.00		
Co	0.00		
Zn	0.02		
Cu	0.00		
Na	18.6, 26.6	26.4	17.3
K	0.94		
Li	0.11		

The purified AmyK38 (15 mg/mL) was dialyzed at 5°C. The dialysis was done twice over the course of 36 h against 10 mM glycine-NaOH (pH 10), the same buffer plus 1 mM EDTA, or 10 mM acetate buffer (pH 4.5). The metal concentration was measured by atomic absorption at 393.36 nm using ICP emission spectral analysis, assuming a molecular mass of AmyK38 of 55,000 Da. It is expressed in mol per mol of enzyme. Numbers in parentheses represent the specific activities after dialysis. The specific activity of the undialyzed sample was 4435 U/mg.

告された²³⁾。AmyK38の全体構造は基本的にBLAと同様であり、酸化失活に係わるメチオニン残基ならびにカルシウムは存在しなかったが、構造中3カ所にナトリウムが存在し、うち二つはBLAのCaI, CaIIIに相当する部位に、もう一つはドメインA中に存在した (Fig. 10)。この解析結果より、AmyK38はカルシウムの代わりにナトリウムを利用して活性のある構造を維持していることが実証された。

6. 蛋白質工学による耐熱化

上述したように、AmyK38は天然型でありながら、洗剤配合に適した優れた酵素特性を持ち合わすスーパー酵素であるが、ADDなどに応用するには耐熱性の向上が望まれた。そこで、キメラ酵素の構築および分子動力学 (MD) 法による熱不安定部位の推定などにより AmyK38 の耐熱性の向上を検討した。

まず、AmyK38と、AmyKの181位のアルギニン残基と

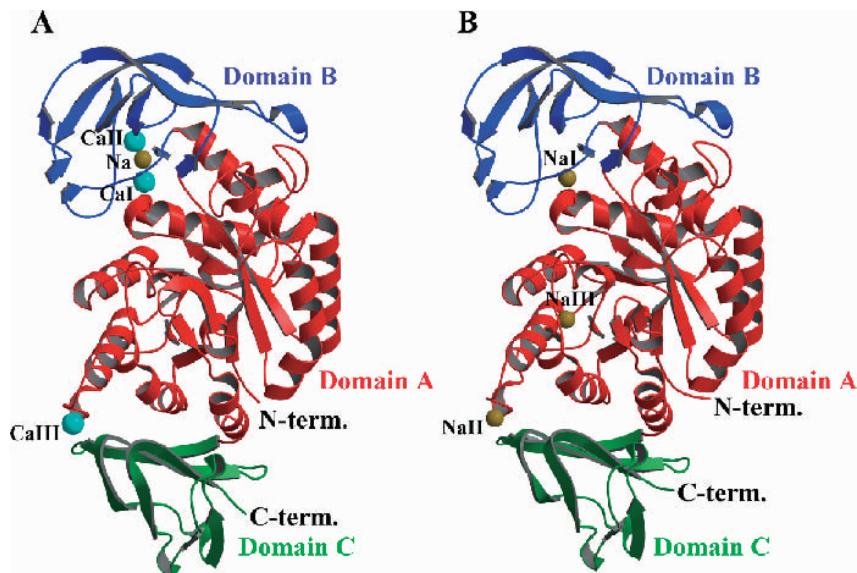


Fig. 10. Stereo view of the ribbon model of the overall structures of BLA (A) and AmyK38 (B).

Domains A, B and C are shown in red, blue and green, respectively. The Ca^{2+} and Na^{+} ions are shown as blue and yellow spheres, respectively. The N and C termini of AmyK38 are in the domains A and C, respectively. Domain A is the most well conserved $(\beta/\alpha)_8$ -barrel domain in α -amylases. Domain C, which is composed of β -strands with the so-called Greek key motif, is also conserved in amylolytic enzymes, except in barley α -amylase. Na I and Na II are located at the sites corresponding to the Ca^{2+} ions (Ca I and Ca III) in the crystal structure of BLA. These figures were drawn by MOLSCRIPT and Raster3D.

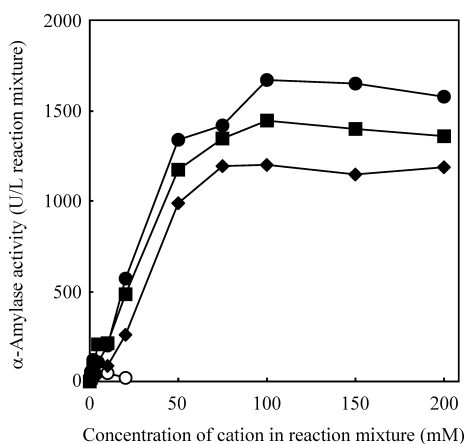


Fig. 9. Effects of some cations on the activity of AmyK38.

The purified AmyK38 (approximately 0.6 mg/mL) was dialyzed at 5°C twice over the course of 24 h against 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5). The enzyme activity was then assayed with 0.03 μg of enzyme at 50°C in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5) plus each cation at the indicated concentrations. The activities manifested in the presence of each cation are shown in U/L reaction mixture. The activity in 50 mM glycine-NaOH buffer (pH 10) without additive was 1300 U/L. ●, the activity with Na; ■, that with K; ▲, that with Li; ○, that with Ca.

182 位のグリシン残基を欠失させた耐熱性変異酵素 (ΔRG) との間で数種のキメラ酵素を構築した²⁴⁾. その結果, AmyK38 の N 末端 19 アミノ酸配列を ΔRG の配列に置き換えたキメラ酵素に耐熱性の向上が認められた (Fig. 11). 一方, MD 法による熱振動により, AmyK38 モデル構造中のドメイン B の構造が大きく壊れることがわかり, この変化はドメイン B を支えていると思われる β ターン部位の構造変化によるものと推定した. 本ターン部位の安定化を指標に, 種々の変異導入を行った結果, 167 位のグルタミン残基をグルタミン酸, ならびに 169 位のチロシン残基を

リジンに置換 (Q167E/Y169K) することにより, 耐熱性が飛躍的に向上することを見出した²⁵⁾.

さらに, N 末端側 19 アミノ酸残基の ΔRG 型への置換および β ターン部位における Q167E/Y169K 変異の導入を組み合わせるにより, 酵素化学的特性を損なうことなく, さらに耐熱性が向上した改変酵素の構築に成功した²⁵⁾.

7. おわりに

産業用酵素の世界市場は, 2002 年で 2250 億円規模に達しているものと推定され, 2005 年には 3000 億円近くにまで拡大すると予測されている²⁶⁾. もっとも大きな市場は洗剤用酵素であり, 全体の約 25% を占める. 近年, 蛋白質工学的的手法により得られた変異型酵素が洗剤市場においても実績を上げており, また, 進化分子工学的アプローチも確立されつつある. しかし, 酵素開発において基本となるのは, 本稿で紹介した AmyK38 に代表されるスクリーニングであることも強く提示したい. また, カルシウムが構造, 活性を維持するのが菌体外酵素の常識だったが, カルシウムを含まない AmyK38 の詳細な研究が, 蛋白質の進化の謎を解く一助となることを期待する.

平成 16 年度本学会奨励賞にご推薦を賜りました東日本支部長の神田鷹久先生, 北海道支部長の松井博和先生, ご選考いただきました本学会長の坂野好幸先生, 前会長の谷口 肇先生をはじめ, 選考委員会の諸先生方に厚く御礼申し上げます.

本研究は, 主として花王株式会社生物科学研究所で行ったものです. 研究の機会をいただきました弊社取締役常務執行役員・研究開発部門統括の高石尚武博士, 元所長の津

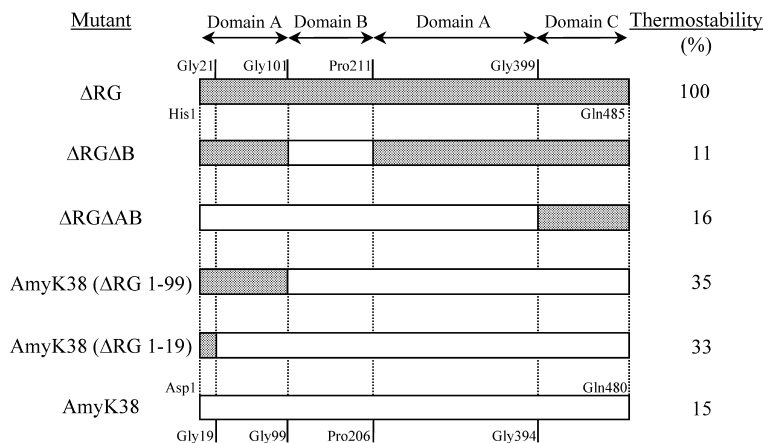


Fig. 11. Structures of several chimeric genes and the thermostabilities of the chimeric enzymes.

Open and closed bars indicate the DNA fragments derived from AmyK38 and Δ RG genes, respectively. The chimeric enzymes were composed of (in AmyK38 numbering): Δ RG Δ B, 1–99 of Δ RG, 100–206 of AmyK38, and 207—the C-terminal end of Δ RG; Δ RG Δ AB, 1–394 of AmyK38 and 395—the C-terminal end of Δ RG; AmyK38 (Δ RG 1–99), 1–99 of Δ RG and 100—the C-terminal end of AmyK38; AmyK38 (Δ RG 1–19), 1–19 of Δ RG and 20—the C-terminal end of AmyK38. AmyK38, Δ RG, and the chimeric enzymes were purified individually from cultures of recombinant *B. subtilis* ISW1214. Each enzyme was incubated at 50°C in 50 mM glycine-NaOH buffer (pH 10). Samples (0.1 mL) were withdrawn after a 30-min incubation, and then the residual activities in the samples were immediately measured at the same temperature and pH. The values shown are percentages of the respective activities of enzymes kept at 5°C for 30 min, which are taken as 100%.

寫力雄博士，前所長の手嶋 亨氏に深謝いたします。また，所長の武馬吉則博士にお礼申し上げます。

本研究は，京都大学大学院理学研究科教授の三木邦夫先生，同研究科の喜田昭子博士，藤橋雅宏博士，野中 剛博士，筆者の研究室の先輩，同僚諸氏，特に，元室長の伊藤進博士（現 独立行政法人海洋研究開発機構プログラムディレクター），前室長の川合修次博士，室長の尾崎克也博士，小澤忠弘氏，五十嵐一暁博士，北山香織氏，林 康弘氏，遠藤圭二氏，小林 徹博士（現 独立行政法人海洋研究開発機構グループリーダー）との共同成果であります。この場を借りて深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) M. Vihinen and P. Mäntsäla: Microbial amyolytic enzymes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **24**, 329–418 (1989).
- 2) K. Horikoshi: Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**, 735–750 (1999).
- 3) H. Bisgaard-Frantzen, A. Svendsen, B. Norman, S. Pedersen, S. Kjærulff, H. Outtrup and T.V. Borchert: 1999. Development of industrially important α -amylases. *J. Appl. Glycosci.*, **46**, 199–206 (1999).
- 4) J.E. Nielsen and T.V. Borchert: Protein engineering of bacterial α -amylase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1543**, 253–274 (2000).
- 5) H. UpaDek and B. Kottwitz: Application of amylases in detergents. in *Enzymes in Detergency*, J.H. van Ee, O. Misset and E.J. Baas, eds., Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 203–212 (1997).
- 6) N. Saito: A thermophilic extracellular α -amylase from *Bacillus licheniformis*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **155**, 290–298 (1973).
- 7) S. Ito, T. Kobayashi, K. Ara, K. Ozaki, S. Kawai and Y. Hatada: Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles: enzymatic properties, genetics, and structures. *Extremophiles*, **2**, 185–190 (1998).
- 8) K. Igarashi, Y. Hatada, H. Hagihara, K. Saeki, M. Takaiwa, T. Uemura, K. Ara, K. Ozaki, T. Kobayashi and S. Ito: Enzymatic properties of a novel liquefying α -amylase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate and entire nucleotide and amino acid sequences. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 3282–3289 (1998).
- 9) K. Igarashi, Y. Hatada, K. Ikawa, H. Araki, T. Ozawa, T. Kobayashi, K. Ozaki and S. Ito: Improved thermostability of a *Bacillus* α -amylase by deletion an arginine-glycine residue is caused by enhanced calcium binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **248**, 372–377 (1998).
- 10) B.L. Vallee, E.A. Stein, W.N. Sumerwell and E.H. Fischer: Metal content of α -amylases of various origins. *J. Biol. Chem.*, **234**, 2901–2905 (1959).
- 11) T. Yamamoto: Bacterial α -amylase (liquefying and saccharifying types) of *Bacillus subtilis* and related bacteria. in *Handbook of Amylases and Related Enzymes*, The Amylase Research Society of Japan, ed., Pergamon Press, Oxford, pp. 40–45 (1988).
- 12) W. Aehle: Development of new amylases, in *Enzymes in Detergency*, J.H. van Ee, O. Misset and E.J. Baas, eds, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 213–229 (1997).
- 13) 上島孝之: 酵素テクノロジー, 幸書房, 東京, p. 8(1999).
- 14) H. Hagihara, Y. Hatada, T. Ozawa, K. Igarashi, H. Araki, K. Ozaki, T. Kobayashi, S. Kawai and S. Ito: Oxidative stabilization of an alkaliphilic *Bacillus* α -amylase by replacing a single specific methionine residue by site-directed mutagenesis. *J. Appl. Glycosci.*, **50**, 367–372 (2003).
- 15) H. Hagihara, K. Igarashi, Y. Hayashi, K. Endo, K. Ikawa-Kitayama, K. Ozaki, S. Kawai and S. Ito: Novel α -amylase that is highly resistant to chelating reagents and chemical oxidants from the alkaliphilic *Bacillus* isolate KSM-K38. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 1744–1750 (2001).
- 16) H. Hagihara, Y. Hayashi, K. Endo, K. Igarashi, T. Ozawa, S. Kawai, K. Ozaki and S. Ito: Deduced amino-acid sequence of a calcium-free α -amylase from a strain of *Bacillus*. *Eur. J. Biochem.*, **268**, 3974–3982 (2001).
- 17) R. Nakajima, T. Imanaka and S. Aiba: Comparison of amino acid sequences of eleven different α -amylases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 355–360 (1986).
- 18) M. Machius, N. Declerck, R. Huber and G. Wiegand: Activation of *Bacillus licheniformis* α -amylase through a disorder \rightarrow order transition of the substrate-binding site mediated by a calcium-sodium-calcium metal triad. *Structure*, **6**, 281–292 (1998).
- 19) Y. Tachibana, M.M. Leclere, S. Fujiwara, M. Takagi and T. Imanaka: Cloning and expression of the α -amylase gene from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus* sp. KOD 1, and characterization of the enzyme. *J. Ferment. Bioeng.*, **82**, 224–232 (1996).
- 20) S. Jørgensen, C.E. Vorgias and G. Antranikian: Cloning, se-

- quencing, characterization, and expression of an extracellular α -amylase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.*, **272**, 16335–16342 (1997).
- 21) G. Dong, C. Vieille, A. Savchenko and J.G. Zeikus: Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding extracellular α -amylase from *Pyrococcus furiosus* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 3569–3576 (1997).
- 22) A. Savchenko, C. Vieille, S. Kang and J.G. Zeikus: *Pyrococcus furiosus* α -amylase is stabilized by calcium and zinc. *Biochemistry*, **41**, 6193–6201 (2002).
- 23) T. Nonaka, M. Fujihashi, A. Kita, H. Hagihara, K. Ozaki, S. Ito and K. Miki: Crystal structure of calcium-free α -amylase from *Bacillus* sp. strain KSM-K38 (AmyK38) and its sodium ion binding sites. *J. Biol. Chem.*, **278**, 24818–24824 (2003).
- 24) H. Hagihara, K. Igarashi, Y. Hayashi, K. Kitayama, K. Endo, T. Ozawa, K. Ozaki, S. Kawai and S. Ito: Improvement of thermostability of a calcium-free α -amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. by protein engineering. *J. Appl. Glycosci.*, **49**, 281–289 (2002).
- 25) 花王株式会社, 遠藤圭二, 五十嵐一暁, 林 康弘, 萩原浩, 尾崎克也: 変異 α -アミラーゼ, 特開 2001-54392, 2001-02-27.
- 26) 産業用酵素工業の現状. ファインケミカル, **33**, 43–51 (2004).