

微生物に由来する多糖分解酵素の コスメトロジーへの応用

東京工業大学 生命理工学部

中 村 聡

β -1,4-Xylans, major components of plant hemicelluloses, are heterogeneous polysaccharides that have a backbone of β -1,4-linked xylopyranose units. Xylanases (1,4- β -D-xylan xylanohydrolase; EC3.2.1.8) catalyze the hydrolysis of xylan to xylooligosaccharides and xylose. Recently, we have isolated alkaliphilic *Bacillus* sp. strain 41M-1 from soil. Strain 41M-1 secreted multiple xylanases and one major form of them, termed xylanase J, had an alkaline pH optimum. In this study, we describe cloning, sequencing and specific mutagenesis of the gene encoding xylanase J from strain 41M-1.

A genomic library of strain 41M-1 was screened for xylanase activity to obtain a 2.2-kb Eco RI-Sph I fragment containing the xylanase J gene. Then, the nucleotide sequence of the 2.2-kb fragment was determined. The putative xylanase J gene contained an open reading frame of 1,062 bp and encoded a 27-aa leader peptide followed by a 327-aa mature enzyme. The promoter-like sequence and typical Shine-Dalgarno sequence were observed upstream from the possible TTG start codon. A perfect 14-bp inverted repeat, corresponding to a transcriptional terminator, occurred downstream from the TAG stop codon.

The xylanase J gene was expressed in *Escherichia coli*. More than 90% of xylanase activity was located in the periplasmic space. Characteristics of the *E. coli*-produced xylanase J were quite equal to those of the enzyme from strain 41M-1. The deduced amino acid sequence of xylanase J was compared with the sequences of other bacterial xylanases. The potential catalytic domain of xylanase J was located at the N-terminus and had strong similarity to family G xylanases, suggesting that the enzyme also belonged to the family G hydrolases. A linker sequence rich in Ser, Thr and Pro occurred between the catalytic domain and an additional domain at the C-terminus. This C-terminal domain of unknown function showed no significant similarity to any other proteins.

Two Glu residues, previously identified as essential for catalytic activity in the family G xylanase from *Bacillus pumilus*, are conserved in xylanase J at positions 93 and 183. These two Glu residues were targeted for mutational analysis. Substitution of Glu-93 or Glu-183 by Gln (mutants E93Q and E183Q, respectively) drastically reduced xylanase activity. The carboxylic residues of these two Glu would probably act by general acid catalysis as has been shown for other hydrolytic enzymes such as lysozyme. The enzyme activity of xylanase J was inhibited by N-bromosuccinimide, suggesting that Trp and/or Tyr was involved in catalysis. Some of Trp and Tyr in xylanase J were replaced by Phe. The large decrease in activity were observed with the mutant enzymes W18F, W86F, Y84F and Y95F. These results suggest that Trp-18, Trp-86, Tyr-84 and Tyr-95 play important roles in binding of the substrate.

1 緒 言

通常の生物が生育できないような極限環境に棲息する微生物（極限微生物）の存在が知られてい

る¹⁾。これらの極限微生物が生産する酵素は極限条件においても機能するものが多く、その応用性に着目した研究が広く行われてきた。しかしながら、極限微生物由来の酵素がどのようにして極限環境に適応しているかについては、不明な点が多く残されている。わずかに好熱性微生物に由来する酵素について、その耐熱性機構の解明をめざした研究が進められているものの、例えば好アルカリ性微生物由来の酵素のアルカリ性への適応機構に関する研究は、ほとんど行われていないのが現状である。

Application of Microbial Polysaccharide-degrading enzymes to Cosmetology

Satoshi Nakamura

Faculty of Bioscience and Biotechnology,

Tokyo Institute of Technology



β -1,4-キシランは陸上植物の細胞壁中に多く含まれる多糖であり、D-キシロースが β -1,4結合を介して連なった主構造をとる。キシランの β -1,4結合を加水分解する酵素がキシラナーゼ(1,4- β -D-xylan xylanohydrolase; EC3.2.1.8)である。近年、綿実穀・トウモロコシなどから抽出した多糖類をキシラナーゼ処理して生産したキシロオリゴ糖が、皮膚保湿成分として化粧品に配合され、市販されるに至っている。一般に、キシランなどの多糖類はアルカリ性で水に溶けやすくなることから、植物多糖の分解によるキシロオリゴ糖生産を目的とした場合、アルカリ性条件下で高活性を有するキシラナーゼが有利であることは論を待たない。

キシラナーゼは、多くの細菌や糸状菌などによって生産される^{2, 3)}。現在までに報告されている微生物由来のキシラナーゼのほとんどは、反応の至適pHを酸性から中性領域に有するものであった。一方、好アルカリ性微生物や耐アルカリ性微生物の生産するキシラナーゼも報告されている⁴⁾。これらのキシラナーゼの中には広い作用pH範囲をもつものもあるが、アルカリ性側に反応の至適を有する酵素はこれまで知られていなかった。以前我々は、キシラナーゼ生産菌である好アルカリ性バシラス属細菌41M-1株の分離に成功している⁵⁾。41M-1株が生産するキシラナーゼの1つ、キシラナーゼJの精製を行い、その諸性質

を検討した。その結果、キシラナーゼJはpH9.0のアルカリ性領域に反応の至適を有する新規な酵素であることが明らかとなった (Table. 1)^{6, 7)}。

本研究では、アルカリ性条件下で高活性を示すことからキシロオリゴ糖生産用の酵素としての利用が期待されるキシラナーゼJを例にとり、その触媒機構や好アルカリ性機構を分子レベルで解明することを目的とした。すなわち、キシラナーゼJをコードする遺伝子のクローニングと大腸菌における発現を行った。さらに、他酵素とのアミノ酸配列比較による機能領域の推定を行い、タンパク質工学による活性アミノ酸残基の特定を試みた。

2 実験

2.1 菌株、プラスミドおよび培地

好アルカリ性バシラス属細菌41M-1株⁵⁾はキシラナーゼ生産菌である。宿主としては大腸菌HB101株(クローニング)、MV1184株(遺伝子発現)、CJ236株およびBMH71-18mutS株(部位特異的変異)を使用した。大腸菌用ベクターにはプラスミドpUC119を用いた。

41M-1株の培養にはアルカリ性天然培地⁵⁾を、そして大腸菌の培養にはL培地⁸⁾を用いた。必要に応じ、キシランやアンピシリンを添加して使用した。

2.2 クローニング技術

遺伝子クローニングおよび塩基配列決定はSambrookら⁹⁾のマニュアルに従って実施した。部位特異的変異はKunkel法⁹⁾で行った。

2.3 キシラナーゼ活性の評価

大腸菌の培養物を菌体外・ペリプラズム・菌体内画分に分離¹⁰⁾した。各画分に含まれるキシラナーゼの活性測定は、既報⁵⁾に従って実施した。反応はpH9.0、37°Cで10分間行い、基質キシランの濃度は1.2%とした。

Table. 1 Properties of xylanase J

Molecular mass	36.0 kDa
pI	pH 5.3
Optimum pH	pH 9.0 (at 37°C)
Optimum temperature	50°C (at pH 9.0)
Temperature stability	≤55°C (at pH 9.0)
Inhibited by	HgCl ₂ , N-bromosuccinimide
Main products	≥X ₂
K _m value	3.3 mg/ml
V _{max} value	1,100 μmol/min-mg

各種変異型キシラナーゼJの活性評価には、ペリプラズム画分を用いた。各ペリプラズム標品に含まれる野生型あるいは変異型酵素の定量は、野生型キシラナーゼJに対するウサギ抗血清を用いた抗原ELISA法にて行った。活性測定とELISA法によるタンパク質定量の結果から、比活性を算出した。

3 結果と考察

3.1 キシラナーゼJ遺伝子のクローニング

好アルカリ性バシラス属細菌41M-1株の染色体DNAライブラリーを作製した。キシランを含む寒天培地上でのハローの形成を指標として、キシラナーゼJ遺伝子を含む陽性クローンを選抜した。サブクローン解析の結果、キシラナーゼJ遺伝子は約2.2kbのEcoRI-SphI断片中にコードされていることがわかった。このキシラナーゼJ遺伝子断片を含む組換えプラスミドpAXJ3Rの制限酵素地図をFig.1に示す。

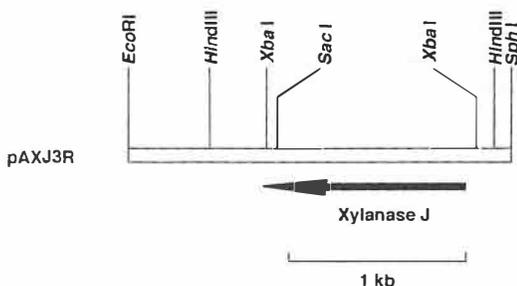


Fig.1 Restriction map of the plasmid pAXJ3R. The double line represents the chromosomal DNA fragment from strain 41M-1. The arrow shows the position of the xylanase J gene.

キシラナーゼJ遺伝子を含むDNA断片の塩基配列を決定したところ、1,062塩基からなる、354アミノ酸をコードするオープンリーディングフレーム(ORF)が見出された(Fig.2)。このORFは翻訳開始コドンとしてTTGを使用しているが、キシラナ

ーゼJ遺伝子の5'上流域に部位特異的変異で塩基置換を導入した実験から、その妥当性が確認されている(データ示さず)。ORFの上流には、細菌において機能しうるプロモーター様配列(-35領域および-10領域)およびShine-Dalgarno配列が認められた。そして終止コドンTAGの49塩基下流には、ターミネーターとして機能しうる逆向き反復配列(14塩基x2)が見出された。

キシラナーゼJタンパク質のアミノ末端(N末端)アミノ酸配列⁷⁾との比較により、成熟型酵素はアラニンから始まる327アミノ酸から構成されることがわかった。成熟型酵素の上流に存在する27アミノ酸は、分泌に関与するシグナルペプチドと考えられた。

3.2 キシラナーゼJ遺伝子の大腸菌における発現

プラスミドpAXJ3Rを有する大腸菌の培養を行い、菌体外・ペリプラズム・菌体内画分に分画した後、各画分に含まれるキシラナーゼ活性を調べた。その結果、41M-1株由来のプロモーターの働きでキシラナーゼJ遺伝子の大腸菌における発現が起こり、90.3%の活性がペリプラズム画分に局在することがわかった(Table.2)。ペリプラズム画分に含まれるキシラナーゼを精製し、その性質を調べたところ、大腸菌が産生した組換え型キシラナーゼJも41M-1株由来の酵素と同様な性質を有していた(データ示さず)。組換え型キシラナーゼJのN末端アミノ酸配列も41M-1株由来の酵素と同一であり、キシラナーゼJのシグナルペプチドがペリプラズムへの分泌に際して機能したものと考えられた。

3.3 キシラナーゼJおよび他酵素のアミノ酸配列比較

遺伝子配列より類推されるキシラナーゼJのアミノ酸配列を、他のキシラナーゼのものと比較した。その結果、キシラナーゼJのN末端側2/3の領域は、*Bacillus pumilus*に由来するキシラナ

ATCTATACTTGTAAAGTGATATTGGGAAAAGAGTTTGATAACATTAAATGTAAGCGTTTACAAATATTGACTAAAGGAGGTATTCTAG
 -35 -10

AATTTTCGTTATGATCCAAACCGTAAAAAATTATAGGAGGTATGCCGTTTGAACAAGTAAAAATCATGTTTTTAATGACGATGTTTTTA
 SD M K Q V K I M F L M T M F L

GGAATTGGTTTGTATTTTCTCTGAAAAATGCAGAGGCAGCTATTACTTCTAATAGATTGGCACACATGACGGATATGACTATGAATTT
 G I G L L F F S E N A E A A I T S N E I G T H D G Y D Y E F

TGGAAGGACAGCGGTGGTTCTGGAAGTATGACATTAATAGTGGAGGCACATTTAGTGCTCAATGGAGTAATGTGAACAACATTTTATTC
W K D S G G S G S M T L N S G G T F S A Q W S N V N N I L F

CGTAAAGGAAAAAGTTTGATGAGACAAAACCTCATCAACAAATGGAAATATGTCCATTAACATGTTGCCACTTACAATCCTAATGGA
R K G K K F D E T Q T H Q Q I G N M S I N Y G A T Y N P N G

AACTCCTATTTAACTGTATATGGTTGGACAGTAGATCCCTTAGTAGAATTTTATATTGTTGATAGCTGGGAAACGTGGCGTCCGCCAGT
 N S Y L T V Y G W T V D P L V E F Y I V D S W G T W R P P G

GGAACACCGAAAGGAACGATTAATGTAGATGGTGAACCTTATCAAATATATGAAACCACACGCTATAACCAACCATCTATAAAGGAAC
 G T P K G T I N V D G G T Y Q I Y E T T R Y N Q P S I K G T

GCAACTTTTCAGCAACTACTGGAGCGTAAGAACCCTCAAACCTACAAGTGAACGATTTCTGTGAGCGGAGCACTTTAGAGCTTGGGAAAGT
 A T F Q Q Y W S V R T S K R T S G T I S V S E H F R A W E S

TTAGGTATGAATATGGGAAATATGTACGAGGTTGCTTTAACGGTCGAGGGCTACCAAAGTAGCGGGAGCGCAAATGTTTATAGCAATACC
 L G M N M G N M Y E V A L T V E G Y Q S S G S A N V Y S N T

TTAACATATAGGAGGACAATCTGGTGGTGGAGCAAGCAACTAGAGTAGAAGCAGAAAGTATGACAAAGGTTGGACCTTACACCTCTAATATT
 L T I G G Q S G G E Q A T R V E A E S M T K G G P Y T S N I

ACTTCTCCTTTAACGGGATGCTTTATATGCAAAATGGTGATAATGTGAGCTTTAATCATTCAACCAAGCAACAGTAGTTTTTCA
 T S P F N G V A L Y A N G D N V S F N H S F T K A N S S F S

TTACGGGAGCCCTCAATAACTCAACATGGCTAGAGTTGATCTGAGGATAGGTGGTCAAATAGGGGAACCTTTTACTTTGGAGATCAA
 L R G A S N N S N M A R V D L R I G G Q N R G T F Y F G D Q

TATCCGGCTGTCTATAACCATTAATAACATCAACCATGGAATAGGGAAATCAATAGTTCGAGCTCATTGTAACAGCTGATGACGGAACATGG
 Y P A V Y T I N N I N H G I G N Q L V E L I V T A D D G T W

GATGCTTATTAGACTATCTAGAATAAGGTAGATTATAAGTAAACCTTAAAGACTGTTACAGAATAAATCTCTGATTTAAAAAGGTGAA
 D A Y L D Y L E I R

ATGGAAAAATTCATTTACCTTATCTATTTTCTAGGTTGACTGTTAAAGCAGTAGAATCAACTGTTTGTCTCTGTTTTTAATTTAA
 ← →

Fig. 2 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence for the xylanase J gene. The location of the possible promoter (-35 and -10 sites) and Shine-Dalgarno sequences are shown overlined. A terminator-like, inverted repeat sequence is indicated by arrows facing each other. The boxed region denotes the N-terminal amino acid sequence as determined from xylanase J from strain 41M-1.

ゼ¹¹⁾と71%の相同性を有していることが明らかとなった。セルラーゼおよびキシラナーゼは、その触媒ドメインのアミノ酸配列に基づき、11のファミリーに分類されている¹²⁾。現在までに全塩基配列が決定されているキシラナーゼは、すべてファミリーFまたはGに分類されている。上述の*B. pumilus* キシラナーゼはファミリーGに属することが知られている。キシラナーゼJのN末端側の2/3は他のファミリーGキシラナーゼとも36~69%の高い相同性を示したことより (Fig. 3)、本酵素もファミリーGに属するものと考えられた。

N末端側のファミリーG触媒ドメインのさらにカルボキシル末端(C末端)側には、約100残基からなるポリペプチド鎖が結合している。このC末端側1/3に相当する領域について相同性検索を行ったところ、既知タンパク質との間にアミノ酸配列の相同性は認められず、その機能は不明であった。

キシラナーゼJのN末端側の触媒ドメインとC末端側の機能未知領域との間には、セリン・スレオニン・プロリンに富む領域が認められた。この領域は、ドメイン間に存在し、連結機能を果たす

ンカー配列と考えられた。以上の解析結果に基づくキシラナーゼJのドメイン構成を Fig. 4に示した。

3.4 触媒活性に関与するアミノ酸残基の特定

キシラナーゼJの触媒活性に関与するアミノ酸残基を特定する目的で、その触媒ドメインにアミ

Table.2 Subcellular distribution of xylanase activity in E. coli carrying pAXJ3R

Fraction	Activity (U/ml-culture) [%]	
Extracellular	0.495	[9.1]
Periplasmic	4.90	[90.3]
Cytoplasmic	0.0300	[0.6]

Table.3 Specific activity of xylanase mutants

Enzyme	Activity (U/ml-culture)	Protein (mg/ml-culture)	Specific activity (U/mg)
Wild type	4.3	0.033	130
E93Q	0.20	0.10	2.0
E183Q	<0.001	0.069	<0.014
W18F	1.4	0.072	20
W86F	0.98	0.030	32
W100F	5.6	0.039	140
W103F	2.1	0.013	160
W144F	5.2	0.030	170
W165F	7.6	0.081	94
Y80F	8.9	0.066	140
Y84F	0.005	0.048	0.11
Y95F	0.006	0.048	0.13
Y121F	0.95	0.0051	190
Y185F	4.4	0.017	260

```

1  AITSNEIGTHDGYDFWKDSGGSGSMTLNSGGTFSAQWSNVNNILFRKGGKFDETQTHQQIGNMSINYGATYNPNGNSYLTIVYGWTVDP 90
   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
91  LVEFYIVDSWGTWRPPGGTTPKGTINVDGGTYQIYETTRYNQPSIKGTATFQQYWSVRTSKRTSGTISVSEHFRAWESLGMNMGMYEVAL 180
   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
181  TVEYQSSGSANVYSNTLTIGGQSGGEQATRVEAESMTKGGPYTNSITSPFNQVALYANGDNVSNFHSFTKANSSFLRGASNNSNMARV 270
   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
271  DLRIGGQNRGTFYFGDQYPAVYTINNINHGIGNQLVELIVTADDGTWDAYLDYLEIR 327
    
```

Fig.3 Amino acid sequence of xylanase J. Amino acids that are conserved at least 70% of known family G xylanase sequences are shown by asterisks. Putative catalytic residues are boxed.

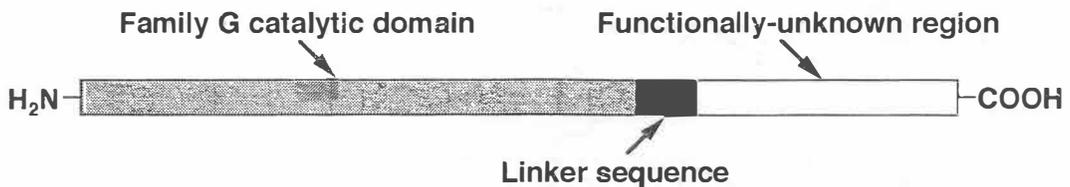


Fig.4 Structural feature of xylanase J.

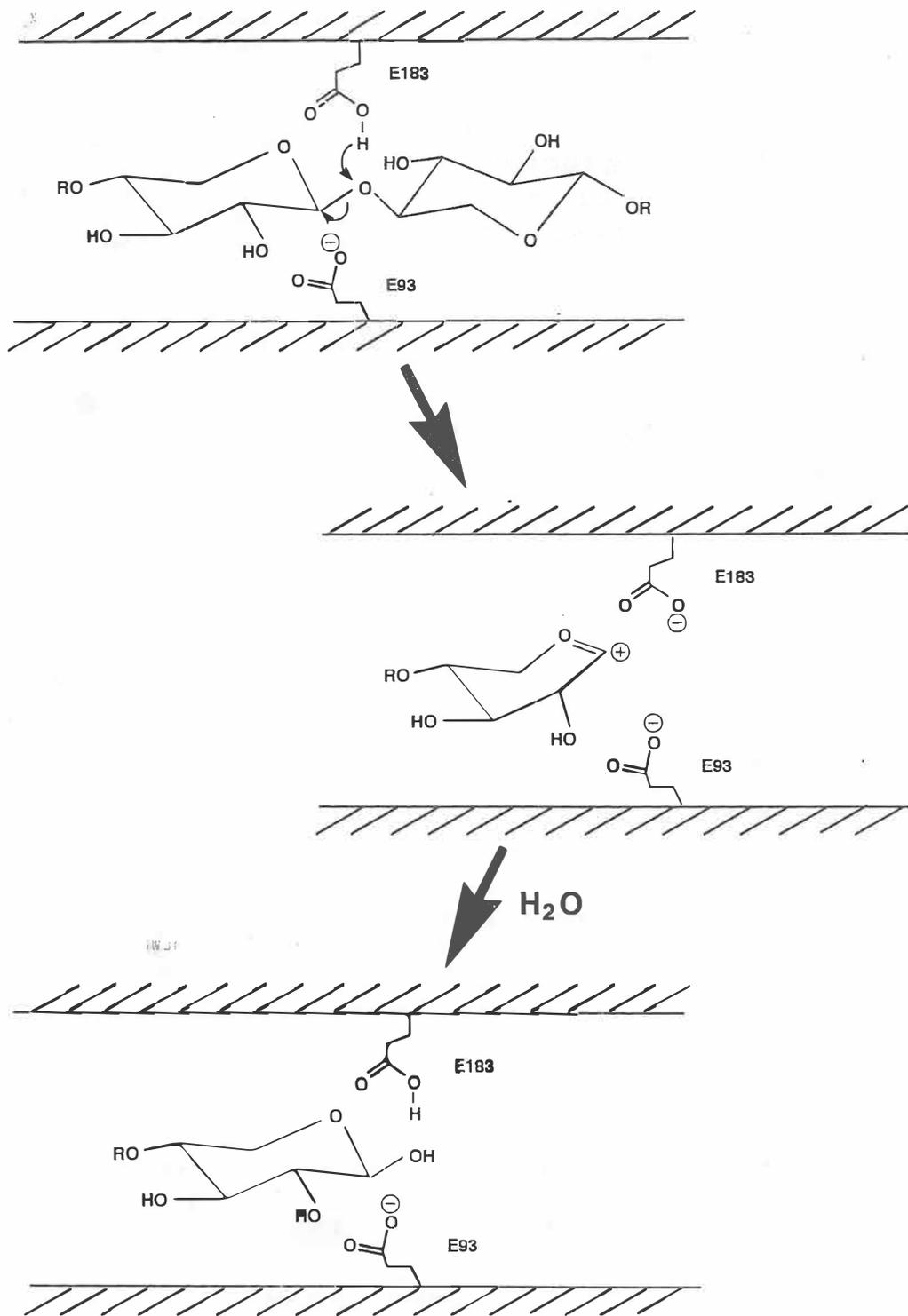


Fig. 5 Putative reaction mechanism of xylanase J.

ノ酸置換を施した変異型酵素を調製し、野生型酵素との活性比較を行った。本酵素と相同性の高い *B. pumilus* キシラナーゼにおいては、触媒活性に関与する2つのグルタミン酸残基が既に同定されている¹³⁾。これらのグルタミン酸残基は他のすべてのファミリーGキシラナーゼにおいても保存されており、キシラナーゼJにおいてはGlu93およびGlu183が対応している。これら2つのグルタミン酸のグルタミンへの置換（それぞれ、変異体E93QおよびE183Q）により活性は大きく低下した

ことから (Table. 3)、本酵素においてもGlu93およびGlu183が触媒残基として機能していると考えられた¹⁴⁾。細菌細胞壁分解酵素のリゾチームに関しては既に詳細な研究がなされており、2つのカルボキシル基が関与する触媒機構が明らかにされている¹⁵⁾。*B. pumilus* キシラナーゼについてもリゾチームになぞらえた触媒機構が提唱されており、キシラナーゼJにおいても同様な触媒機構が考えられた (Fig. 5)。

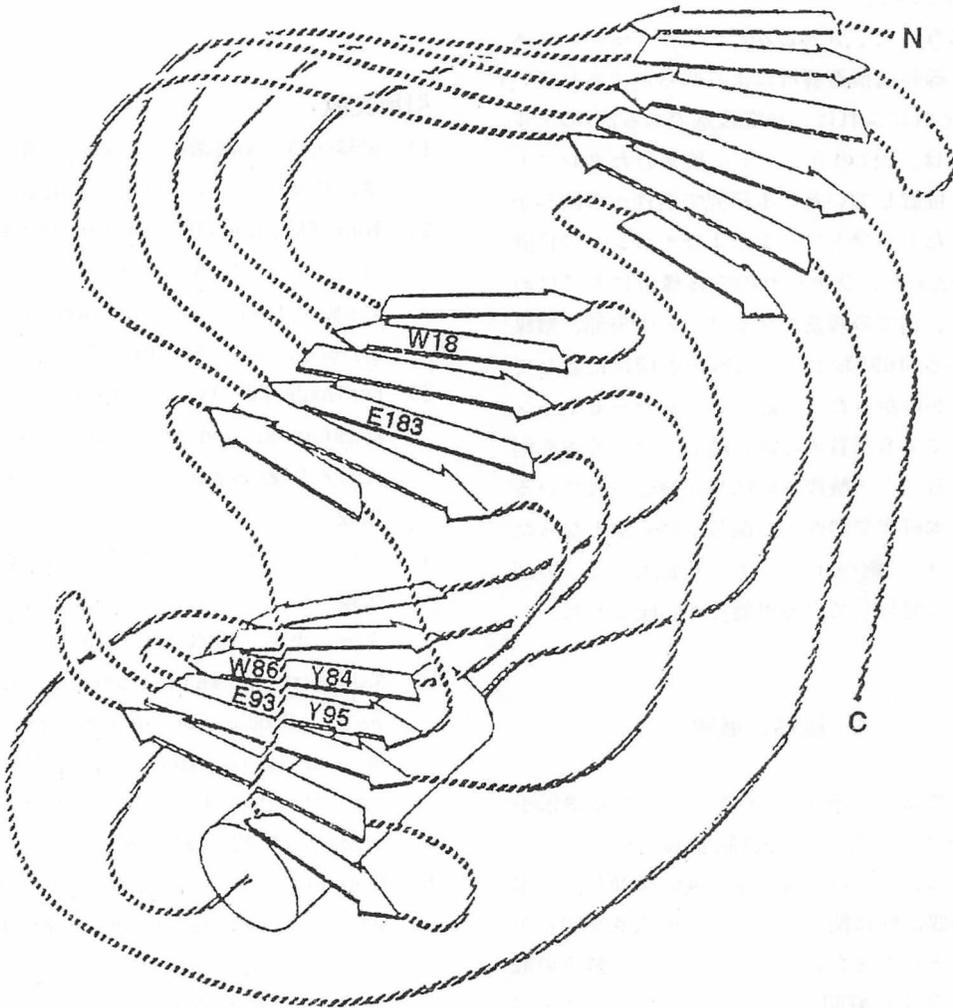


Fig. 6 Tertiary structure of *B. pumilus* xylanase. E93, E183, W18, W86, Y84 and Y95 indicate the corresponding position of Glu-93, Glu-183, Trp-18, Trp-86, Tyr-84 and Tyr-95 in xylanase J, respectively.

キシラナーゼJの活性はN-ブロモコハク酸イミドによる阻害を受け、トリプトファンやチロシンなどのアミノ酸残基の活性への関与が示唆されていた⁷⁾。そこで、本酵素の触媒ドメイン中に存在するトリプトファン・チロシンのうち、11カ所にアミノ酸置換(フェニルアラニンへ置換)を施した。その結果、Trp18, Trp86, Tyr84およびTyr95の活性へ関与への関与が示唆された(Table. 3)¹⁴⁾。キシラナーゼ活性に関与するトリプトファン残基はこれまで特定されておらず、本研究が初めての例である。

最近になって、*B. pumilus* キシラナーゼの立体構造がX線結晶構造解析により明らかにされている¹⁶⁾。それによれば、触媒残基である2つのグルタミン酸は、2枚の β シートに挟まれたクレフトの内部に位置している。本研究で活性への関与が示唆されたトリプトファンおよびチロシンの位置を*B. pumilus* キシラナーゼの立体構造にあてはめてみると、全ての残基がクレフトの中央部、触媒残基であるGlu93およびGlu183の近傍に位置していることがわかった(Fig. 6)。セルラーゼやキシラナーゼによる基質の認識に際しては、芳香族側鎖を有するアミノ酸残基の関与が報じられている^{17, 18)}。本研究で活性への関与が明らかとなったトリプトファンやチロシンも、基質キシランの認識と結合に関与している可能性が示唆された。

4 総括と展望

本研究ではキシラナーゼJをコードする遺伝子をクローニングし、その機能領域の推定を行った。さらに、タンパク質工学的検討を通じて、本酵素の触媒活性に関与するアミノ酸残基を明らかにすることができた。しかしながら、本酵素の触媒機構が完全に解明されたわけではなく、C末端側に存在するポリペプチド領域の機能も依然として不明である。今後は、触媒ドメインにアミノ酸置換を導入した各種変異型酵素の性質を詳細に調

べると共に、C末端側領域の機能解析を行い、本酵素の触媒機構と好アルカリ性機構を解明していきたい。

最近我々が分離した好熱好アルカリ性バチラス属細菌TAR-1株は、pH9.0というアルカリ性条件において70°Cに反応の至適を有する好熱性アルカリキシラナーゼを生産する¹⁹⁻²¹⁾。本研究で実施したようなタンパク質工学的検討を、自然界からのスクリーニングと併用することによって、より高温・高アルカリ性条件下で機能するようなキシラナーゼの取得が可能になるものと確信している。

引用文献

- 1) 掘越弘毅：極限微生物：新しい遺伝子資源，講談社サイエンティフィック，東京，1988.
- 2) Wong KKY, Tan LUL, Sadler JN: Multiplicity of β -1, 4-xylanase in microorganisms: functions and applications, *Microbiol. Rev.*, 52 305-317 1988
- 3) Bastawde KB: Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 8 353-368 1992
- 4) 中村 聡：キシラナーゼ，掘越弘毅，秋葉暁彦編：好アルカリ性微生物，学会出版センター，東京，1993，216-213 頁.
- 5) Nakamura S, Wakabayashi K, Nakai R, *et al.*: Production of alkaline xylanase by a newly isolated alkaliphilic *Bacillus* sp. strain 41M-1, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 9 221-224 1993
- 6) Nakamura S, Wakabayashi K, Horikoshi K, *et al.*: Alkaline xylanase Produced by newly isolated alkaliphilic *Bacillus* sp., In: Visser J, Beldman G, Kustervan Someren MA, *et al.* (eds): Xylans and xylanases, Elsevier Science, Amsterdam, 1992 443-446
- 7) Nakamura S, Wakabayashi K, Nakai R, *et al.*

- :Purification and some properties of an alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain 41M-1, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59 2311-2316 1993
- 8) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T :Molecular cloning : a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- 9) Kunkel TA, Robert JD, Zakour RA : Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phentypic selection, *Methods Enzymol.*, 154 367-382 1987
- 10) Nakamura S, Masegi T, Kitai K, *et al.* : Extracellular production of human tumor necrosis factor- α by *Escherichia coli* using chemically-synthesized gene, *Agric. Biol. Chem.*, 54 3241-3250 1990
- 11) Fukusaki E, Panbangred W, Shinmyo A, *et al.* : The complete nucleotide sequence of the xylanase gene (xyn A) of *Bacillus pumilus*, *FEBS Lett.*, 171 197-201 1984
- 12) Henrissat B, Bairoch A: New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities, *Biochem. J.*, 293 781-788 1993
- 13) Ko EP, Akatsuka H, Moriyama H, *et al.* :Site-directed mutagenesis at aspartate and glutamate residues of xylanase from *Bacillus pumilus*, *Biochem. J.*, 288 117-121 1992
- 14) Nakamura S, Nakai R, Namba K, *et al.* :Structure-function relationship of the xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain 41M-1, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 34 99-100 1995
- 15) Kirby AJ:Mechanism and stereoelectronic effects in the lysozyme reaction, *Crit. Rev. Biochem.*, 22 283-315 1987
- 16) 岡田弘輔 : キシラナーゼの構造と機能、山田秀明、別府輝彦、深沢俊夫編: 微生物の機能開発 : バイオ研究の最前線、学会出版センター、東京、1992 253-265 頁.
- 17) Juy M, Amit AG, Alazri PM, *et al.* : Threedimensional structure of a thermostable cellulase, *Nature*, 357 89-91 1992
- 18) Wakarchuk WW, Campbell RL, Sung WL, *et al.* : Mutational and crystallographic analyses of the active site residues of the *Bacillus circulans* xylanase, *Protein Sci.*, 3 467-475 1994
- 19) Nakamura S, Nakai R, Wakabayashi K, *et al.* : Thermophilic alkaline xylanase from newly isolated alkaliphilic and thermophilic *Bacillus* sp. strain TAR-1, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58 78-81 1994
- 20) Nakamura S, Nakai R, Ishiguro Y, *et al.* : Production and partial characterization of a thermophilic alkaline xylanase from thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. strain TAR-1, In: Shimada K, Hoshino S, Ohmiya K, *et al.* (eds) : Genetics, biochemistry and ecology of lignocellulose degradation, Uni Publishers, Tokyo, 334-342 1993
- 21) Nakamura S, Ishiguro Y, Nakai R, *et al.* : Purification and characterization of a thermophilic alkaline xylanase from thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. strain TAR-1, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 1 7-15 1995