

719

Cloning, sequencing and expression of xylanase A gene from *Clostridium josui*

(Fac. Bioresources, ¹Ctr. Mol.Biol.Gent. Mie Univ., ²Nagoya Seiraku Co. Ltd) ○ J.X. Feng, E. Fujino, T. Fujino², S. Karita¹, T. Kimura, K. Sakka, and K. Ohmiya.

【Introduction】 From *C. josui*, a cellulolytic, strictly anaerobic bacterium, having a cellulosome, multi-enzyme complex, four cellulase genes were cloned. Three of them were clustered and members of the cellulosome. However there is no report on xylanase genes from mesophilic clostridia so far. In this work a xylanase gene is isolated from this bacterium and sequenced.

【Methods and Results】 A genomic library of *C. josui* was constructed in λGEM-12 vector and screened for xylanase activity with Congo-red assay. Three plaques expressing xylanase activity were isolated and their lysates had one same enzyme with Mr115kDa on zymograms. Restriction mapping and DNA hybridization showed that they contained a common 6.5 kb fragment. The fragment had an ORF of 3,150 bp encoding a protein of 1,050 amino acids with Mr 115,564 Da, named *xynA* gene. Homology comparison shows that the protein, XynA, is a multi-domain enzyme consisting of an unknown domain, a family 10 (F) catalytic domain, a family IX cellulose binding domain and a slime layer homologous domain. It has no reiterated sequences indicating that it might not associate with cellulosome. This gene can highly express from its own promoter in *E. coli*. The peak activity was reached after 10 hr of growth, but degradation of the enzyme occurred after 6 hr.

【Key Words】 *Clostridium josui*, xylanase, family 10 (F) xylanase, expression

720

アルカリプロテアーゼの結晶構造と高pH耐性の分子構造的要因

白井 剛・○山根 隆・鈴木淳巨・芦田玉一・小林 徹*

伊藤 進* (名大・工・生物機能、花王・生科研*)

【目的】*Bacillus* sp. KSM-K16 の産生するアルカリプロテアーゼ (M-protease) は、酵素活性の至適pHが極めて高いSubtilisin族のセリンプロテアーゼである。M-proteaseの高アルカリ性への適応メカニズムを研究するためにX線結晶構造解析を行った。

【方法及び結果】M-proteaseは、同一の結晶化条件で2種類の結晶 (I、II 型) が得られる。II 型の構造は2.4Å分解能でR=0.189まで精密化されている。より高分解能のデータを与える I 型は、斜方晶系に属し空間群はP2₁2₁2₁、a=62.3, b=75.5, c=47.2Å, Z=4である。現在のモデルはM-proteaseの全269残基、129個の水分子、1個のCa²⁺イオンを含み、8.0 - 1.5Å 分解能の27846反射に対しR=0.172 まで精密化されている。

Subtilisin族にはM-proteaseのようにpH12程度に至適pHを持つものの他に、pH10程度に至適pHを持つものが含まれる。これらの一次構造の比較から、極めてアルカリ耐性の高い酵素に特有で、低pH域に至適性を持つものには見られない部位の立体配置を、解明した結晶構造に基づき検討した。解析結果からは、カルボキシル末端側の領域における荷電アミノ酸の置換と、それによって形成される静電相互作用が重要な役割を果たしている事が示唆された。

Crystal structure of alkaline protease and molecular basis of its high-pH resistance.

Tsuyoshi Shirai, ○Takashi Yamane, Atsuo Suzuki, Tamaichi Ashida, *Tohru Kobayashi, *Susumu Ito

(Dept. Biothechnol., Nagoya Univ., *Tochigi Res. Labo., Kao Corp.)

【Key Words】 X-ray analysis, protease, alkaline resistance