

高度好熱性細菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来 アラニンラセマーゼの大腸菌での発現, 精製及び諸性質の検討

柳谷 昌彦・上前 智・白神 智行・田村 隆
稲垣 賢二

(農芸化学コース)

Expression, Purification and Properties of Alanine Racemase from *Thermus thermophilus* HB8

Masahiko Yanagitani, Satoshi Uemae, Tomoyuki Shiraga,
Takashi Tamura and Kenji Inagaki

(Course of Agrochemical Bioscience)

An alanine racemase (EC 5.1.1.1) from an extreme thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB8, was purified and characterized, and its gene was cloned. The cloned alanine racemase gene (*alr*) was expressed in *Escherichia coli* JM 109. The *alr* gene is composed of a 1080 bp and encoded a 360 amino acid, and was predicted to have a molecular weight of 38,596. The enzyme was purified by heat shock at 70°C for 10min and DEAE Toyopearl 650M column chromatography. The purified enzyme had an optimum pH9.0~10.0 and an optimum temperature of 55°C~60°C. Enzyme activity was retained 100% after incubation of the enzyme at 70°C for 10min. Alanine racemase from *Thermus thermophilus* HB8 is a monomeric enzyme with a molecular mass of 39 kDa.

Key words : alanine racemase, pyridoxal 5'-phosphate, thermostable enzyme, *Thermus thermophilus* HB8

緒 言

Thermus thermophilus HB8は75°C以上の温度で生育可能なグラム陰性の桿菌である。またこの菌の生産するタンパク質は熱安定性が高く、高いpHでも比較的安定である。この性質は研究対象となる酵素を扱う上で非常に有用であり、常温で酵素を精製出来る利点がある。

現在、大阪大学及び理研播磨研究所を中心にして「高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト」が推進されている。このプロジェクトは、タンパク質を始めとする生体分子の立体構造を基にして、一つの細胞全体の生命現象を、原子レベル（物理化学レベル）で理解することを目的としている。ここではそのプロジェクトのモデル生物として、遺伝子操作系が確立されている生物の中で最も高温で生育するという理由から *T. thermophilus* HB8が選択され、同菌のもつ全てのタンパク質が立体構造解析されようとしている。

以前当研究室において、Seow らによって *T. thermophilus* HB8からアラニンラセマーゼ (EC 5.1.1.1) が単離、精製された¹⁾。それによれば、同菌が生産するアラニンラセマーゼは分子量38,000 Daの単量体と推定され、最適pHが8、最適温度が75°Cであった。このような経緯もあり、当研究室もこの「高度好熱菌丸ごと一匹プ

ロジェクト」にアラニンラセマーゼを対象酵素として参加することとなった。

本実験はこのプロジェクトに参加するものである。実験の目的として、大量にアラニンラセマーゼを取得するために酵素生産の効率性から大腸菌クローン株を作成すること、そしてそこから得られた本酵素についての諸性質を検討することを目的とした。

材料と方法

使用菌株、プラスミド

Thermus thermophilus HB8, は研究室保存株を使用した。

本実験では、*Escherichia coli* JM109 {*recA1*, *endA1*, *gryA96*, *thi-1*, *hsdR17*($rk^- mk^+$), *e14^-*($mcrA^-$), *supE44*, *relA1*, Δ (*lac-proAB*)/F' [*traD36*, *proAB^+*, *lacI^q*, *lacZ* Δ M15]} を使用した。プラスミドは pCR^R-TOPO^R と pUC18を使用した。

Received October 1, 2008

岡山大学大学院自然科学研究科

(The Graduate School of Natural Science and Technology,
Okayama University)

菌体の培養・保存

T. thermophilus HB8 の振とう培養には TM 液体培地 (0.8% polypepton, 0.4% yeast extract, 0.2% NaCl, 0.35mM CaCl₂, 0.40mM Mg Cl₂, pH7.5) を用いて75°Cで培養した。また静置培養には TM 固体培地 (0.8% polypepton, 0.2% NaCl, 0.35mM CaCl₂, 0.40mM Mg Cl₂, 3% gellan gum, pH 7.5) を用いて75°Cで培養した。

E. coli JM109の振とう培養には 2 × TY 液体培地 (1.6% polypepton, 1.0% yeast extract, 0.5% NaCl) を用いた。また静置培養には TY 固体培地 (1.0% polypepton, 0.5% yeast extract, 0.8% NaCl, 1.5% agar powder) を用いて37°Cで培養した。プラスミド保持菌の選抜のために、必要に応じて終濃度50 µg/mlになるようにアンピシリンを加えた。菌体は液体培養をし、その培養液に終濃度8%になるようにグリセロールを加え、-80°Cで冷凍保存した。

使用プライマー

Table 1. に示すものを作成し用いた。

Table 1 Cloning and Sequencing primers

cloning primer	
thr U002K	5'-TGAGCGCCCGAATTCATGCGCCCGG-3'
thr L001	5'-GAGCGGACGGCCTGCGAGGCCCTAAGCCTA-3'
sequencing primer	
M13F	5'-AGTCACGACGTTGTA-3'
T.th alr seq sense1	5'-CGTGGCCACCCTGGAGGA-3'
T.th alr seq sense2	5'-TCGGCCCTGCGGGCGGTG-3'
T.th alr seq sense3	5'-CCATCCTCCGGATCCTCG-3'
M13R	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'
T.th alr seq anti1	5'-CCAGAAGCGCCCGTCCG-3'
T.th alr seq anti2	5'-GCGGAGGAGGCCCGAGGA-3'
T.th alr seq anti3	5'-ACAAGGCCCGAGGCGCGG-3'

alr 遺伝子クローニング

Polymerase Chain Reaction (PCR) 法を用い、次のような条件で *Thermus thermophilus* HB8 ゲノムから *alr* 遺伝子を増幅させた。DNA polymerase は、LATAq (TAKARA) を使用した。PCR 反応液に鋳型 DNA としてゲノム DNA を 1 µg, プライマー thrU002K, thrL001 をそれぞれ50ngを加えた。サーマルサイクラーの温度条件は、96°Cで1分間変性・Lとし、このステップを30サイクル行った。

増幅された遺伝子は、TOPO クローニングを用いて TA サブクローニングされた。そこより挿入された *alr* 遺伝子を制限酵素 *Eco*RI, *Pst* I を用いて切断し、アガロースゲル電気泳動により、*alr* 遺伝子を分離した後 EASYTRAP Ver.2 (TaKaRa) を用いて回収した。回収された *alr* 遺伝子を、同様に処理した pUC18 に DNA Ligation Kit Ver.2 (TaKaRa) を用いて繋ぎこみ、発現用プラスミド pUC-*alr* を構築し、*E. coli* JM109 に形質転換を行った。

アラニンラセマーゼの発現と精製

発現プラスミド pUC-*alr* を組み込んだ *E. coli* JM109

を、アンピシリンが入った 2 × TY 液体培地 1.2L, 37°C で19時間培養した。酵素を大量発現させるため終濃度 1 mMになるように IPTG (isopropyl-β-d-thiogalactoside) を加え、さらに37°Cで5時間培養を行った。

菌の集菌は15,000 rpm×10分で遠心分離し、菌体を沈殿させることを繰り返すことにより行った。

集菌された菌体を湿菌体量の約5倍量 (湿菌体 1 g に対し 5 ml) の 0.1M Tris-HCl (トリス-塩酸緩衝液) (pH 9.0), (10 µM PLP, 0.01% 2-メルカプトエタノールを含む), に懸濁した後、150 W×15分で超音波破碎した。この破碎液を15,000 rpm×1時間遠心分離し、沈殿物を除く上清を無細胞抽出液とした。

無細胞抽出液に70°C×10分の加熱処理を施し、15,000 rpm×1時間遠心分離した後、沈殿物を除く上清を熱処理画分とした。

加熱処理画分を透析により10mM Tris-HCl (pH 9.0), (10 µM PLP, 0.01% 2-メルカプトエタノールを含む), にバッファー置換した後、DEAE-トヨパールイオン交換カラム (東ソー) を用いて酵素精製を行った。酵素の溶出には0~200mMの塩化カリウム濃度勾配を持つ10mM Tris-HCl (pH 9.0), (10 µM PLP, 0.01% 2-メルカプトエタノールを含む), を使用したりニアグラジエント法を用いて溶出させた。アラニンラセマーゼ活性を持つ活性画分を回収し、DEAE 画分とした。

DEAE画分を透析により10mM KPB (pH 7.5), (10 µM PLP, 0.01% 2-メルカプトエタノールを含む), にバッファー置換した後、ハイドロキシアパタイトカラム (Bio-Rad) を用いて酵素精製を行った。酵素の溶出には10~400mMの濃度勾配をKPB (pH 7.5), (10 µM PLP, 0.01% 2-メルカプトエタノールを含む), につけてリニアグラジエント法を用いて溶出した。アラニンラセマーゼ活性を持つ活性画分を回収した。

ゲル濾過による分子量の決定

ゲル濾過による分子量測定には標準クロマトグラフィーで分離したものと、HPLC をもちいたものと2種類で測定した。

標準クロマトグラフィーでは、画分を透析により20mM Tris-HCl (pH 9.0), (10 µM PLP, 0.01% 2-メルカプトエタノール, 0.5M 塩化ナトリウムを含む), にバッファー置換した後、Sephacryl S-200 (ファルマシア), カラム φ28mm×150cmを用いて分子量測定を行った。タンパク質の溶出には20mM Tris-HCl (pH 9.0), (10 µM PLP, 0.01% 2-メルカプトエタノール, 0.5M 塩化ナトリウムを含む), を使用し流速を500 µl/分として各画分1.5mlずつ哀愁した。酵素量は50mg相当使用した。分子量マーカーにはゲル濾過スタンダードを使用した。

HPLCでは、画分を限外濾過により0.1M KPB (pH 7.0), にバッファー置換した後、TSK-GEL SW 3000 (東ソー) を用いて分子量測定を行った。HPLC装置は

Waters 600E (Waters) を使用した。タンパク質の溶出には0.1M KPB (pH 7.0) を使用し、流速を1 ml/分として行った。酵素量は20 µg相当使用した。分子量マーカーにはゲル濾過スタンダードを使用した。

酵素活性測定

d-アラニンから l-アラニンへの測定と l-アラニンから d-アラニンへの測定をそれぞれの測定法で行った²⁾。

d-アラニンから l-アラニン

d-アラニンから l-アラニンの生成は、l-アラニンデヒドロゲナーゼ (東洋紡) が生成する NADH (β -nicotinamide adenine dinucleotide, 還元型) を検出することにより行った。NADH 検量線を0~0.2mMの範囲で作成し用いた。1 Uは1分間に d-アラニンから l-アラニンを1 µmol生成する酵素量とした。

測定法1 (初速度測定法)

0.1M CHES (2-シクロヘキシルアミノエタンスルホン酸緩衝液) (pH 9.0), 30mM d-アラニン, 2.5mM NAD⁺ (β -nicotinamide adenine dinucleotide, 酸化型), 10U l-アラニンデヒドロゲナーゼを最終積1.9mlになるように加え、37°Cで5分間以上保温した後、アラニンラセマーゼ酵素溶液を100 µl添加し、340nmの吸光度の増加をタイムコースにより追跡する事で酵素活性を測定した。

測定法2 (生成物定量法)

0.1M CHES (pH 9.0), 30mM d-アラニンを最終積0.85 mlになるように加え、37°Cで5分以上保温した後、アラニンラセマーゼ酵素溶液を50 µl添加し、37°Cで10分間反応させ、50% TCA (trichloroacetic acid) 100 µl添加することで酵素反応を停止させ、サンプル溶液とした。サンプル溶液とは別に、1 M Tris-HCl (pH 9.0), 2.5 mM NAD⁺, 10U l-アラニンデヒドロゲナーゼを最終積1.9 mlになるように加え、37°Cで5分以上保温した後、サンプル溶液を100 µl添加し37°Cで1時間保温した。生成したNADHを340nmの吸光度を取ることにより測定した。

l-アラニンから d-アラニン

l-アラニンから d-アラニンの生成は、d-アミノ酸オキシダーゼ (TCI) が生成するピルビン酸を乳酸デヒドロゲナーゼ (TCI) が還元する際、消費する NADH の量を検出することにより行った。NADH 検量線を0~0.2 mMの範囲で作成し用いた。1 Uは1分間に l-アラニンから d-アラニンを1 µmol生成する酵素量とした。

測定法1 (初速度測定法)

0.1M CHES (pH 9.0), 30mM l-アラニン, 0.16mM NADH, 1.5U d-アミノ酸オキシダーゼ, 27.5U 乳酸デヒドロゲナーゼを最終積1.9mlになるように加え、37°Cで5分間以上保温した後、アラニンラセマーゼ酵素溶液を100 µl添加し、340nmの吸光度の減少をタイムコースにより追跡する事で酵素活性を測定した。

測定法2 (生成物定量法)

0.1M CHES (pH 9.0), 30mM l-アラニンを最終積0.85

mlになるように加え、37°Cで5分以上保温した後、アラニンラセマーゼ酵素溶液を50 µl添加し、37°Cで10分間反応させ、50% TCA 100 µl添加することで酵素反応を停止させ、サンプル溶液とした。サンプル溶液とは別に、0.1 M CHES (pH 9.0), 0.16mM NADH, 1.5U d-アミノ酸オキシダーゼ, 27.5U 乳酸デヒドロゲナーゼを最終積1.9 mlになるように加え、37°Cで5分以上保温した後、サンプル溶液を100 µl添加し、37°Cで1時間保温した。減少した NADH を340 nmの吸光度を取ることにより測定した。

結果と考察

Thermus thermophilus HB8 由来 *alr* 遺伝子のクローニング

Thermus thermophilus HB8 アラニンラセマーゼをコードしている遺伝子 *alr* の全塩基配列はこれまでに決定されている。その遺伝子情報を基に大腸菌クローン株を作成することをまず行った。

alr 遺伝子は1080 bp, 360アミノ酸残基をもち、そこから38,596 Daの分子量を持つことが予想された。この配列 [G+C] 含量は72%であり、T_m 値は98.8°Cであった。*Alr* を中等度好熱性細菌 *Geobacillus* (旧 *Bacillus*) *stearothermophilus* 由来のホモダイマー型のアラニンラセマーゼ^{2,3)} と赤痢菌 *Shigella sonnei* 由来のモノマー型のアラニンラセマーゼ^{4,5)} と比較したところ、*G. stearothermophilus* 由来のものと同率33%の同一性が、*S. sonnei* 由来のものと同率28%の相同性であった (Fig. 1)。*alr* 遺伝子はTAクローニングの手法を用いてサブクローニングされ、pTA-*alr* と命名したプラスミドを得た。

大腸菌における大量発現系の構築・酵素の精製

pTA-*alr* を作製した際に用いたクローニングプライマー thr U002K, thr L001にはそれぞれ *EcoRI*, *Pst I* 認識部位を組み込んでいたので、この制限酵素部位を用いて *alr* 遺伝子を発現プラスミド pUC-18へライゲーションさせた。このようにして作成した *Alr* 発現プラスミドを pUC-*alr* と命名した (Fig. 2)。

pUC-*alr* を持つ *E. coli* JM109大腸菌クローン株は、5 mlの2×TY培地で培養されIPTG誘導された後、無細胞抽出液でD-アラニンに対するアラニンラセマーゼ活性を測定したところ、pUC-*alr* を持たない *E. coli* JM109よりも顕著に活性が高かった。また同無細胞抽出液60°Cで20分間熱処理した後、沈殿物を除いた上清においてもアラニンラセマーゼ活性が残存していた。pUC-*alr* を持たない *E. coli* JM109では全く活性は検出されなかった。このことよりアラニンラセマーゼが *E. coli* JM109内で発現していると、大量にアラニンラセマーゼを取得するために pUC-*alr* を持つ *E. coli* JM109の大量培養を行った。

菌体を超音波破碎した後、70°Cで10分間の熱処理、



Fig. 1 Sequence alignment of alanine racemase.
 T. th, *Thermus thermophilus* HB8 ; G. st, *G. stearothermophilus* ;
 S. so, *Shigella sonnei*. *, conserved amino acid with all species ;
 ., conserved amino acid with two species.

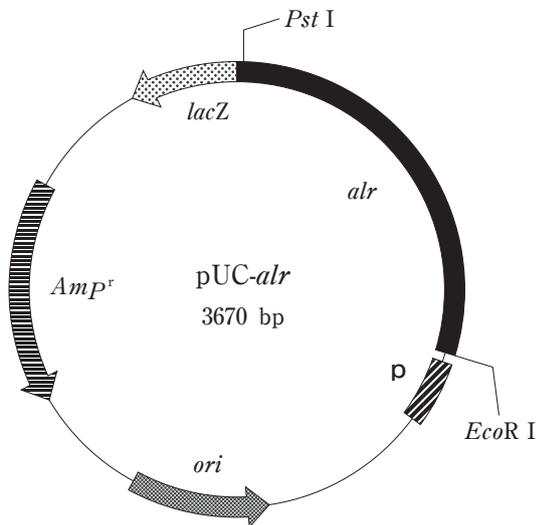


Fig. 2 Restriction map of expression plasmid pUC-almr.
 pUC-almr was constructed by inserting the alanine racemase gene into multi-cloning site of pUC18.

DEAE-トヨパール陰イオン交換カラム, ハイドロキシアパタイトを用いてアラニンラセマーゼの精製を行った(方法参照). 最終的に本酵素は約24倍に精製され, d-アラニンに対する比活性では65.7U/mg (Fig. 3, Table 2)であった.

精製酵素の諸性質の検討

精製されたアラニンラセマーゼの各諸性質を決定した. まずネイティブの状態での分子量を決定するためセファクリルS-200を用いたゲル濾過クロマトグラフィーを行った. 分子量マーカーより検量線を作製し, そこから分子量を求めたところ38 kDaであった (Fig. 4). このことより大腸菌クローン株から精製されたアラニンラセマーゼも単一サブユニットからなるモノマー酵素であることが示された.

アラニンラセマーゼの最適温度, 最適 pH についてそれぞれ両方のラセミ化反応について調べた. 最適温度ではd-アラニンからl-アラニンへの反応では, 55°C, l-アラニンからd-アラニンでは60°Cであり, 最適 pH では両反応とも pH 9.0~10.0であった (Fig. 5, Fig. 6). pH 8.0を境にして酸性領域では極端にラセミ化反応が阻害された. また各アラニンのα位の水素を引き抜きに

Table 2 Purification of alanine racemase from *T. thermophilus* HB8

	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification index (fold)
Cell free extract	1830	680	2.69	100	1.0
Heat treatment	2020	440	4.62	100	1.7
DEAE-Toyoperl	1060	15.8	67.4	58	25
Hydroxyapatite	810	12.3	65.7	44	24

Enzyme activity was assayed in d-to l-alanine direction.

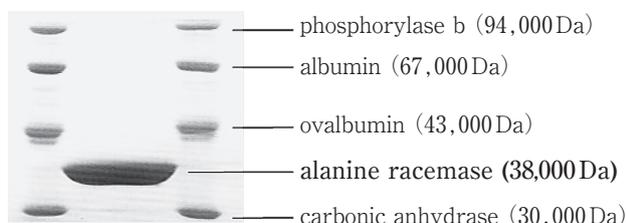


Fig. 3 SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of alanine racemase from *Thermus thermophilus* HB8.

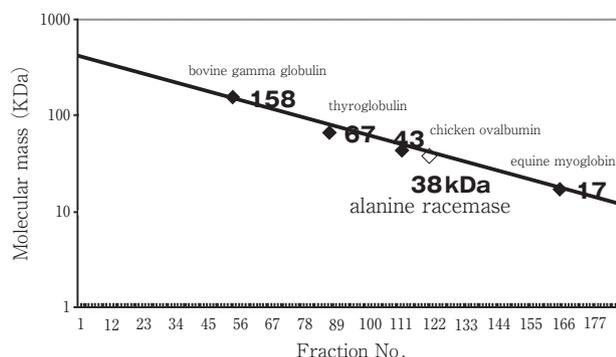


Fig. 4 Determination of the relative molecular mass of alanine racemase by gel filtration through a Superdex 200 column.

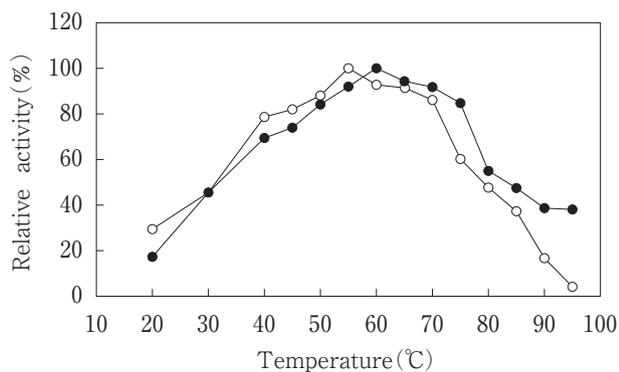


Fig. 5 Optimum temperature of alanine racemase from *T. thermophilus* HB8

—○—, Enzyme activity was assayed in d-to l-alanine direction ; —●—, Enzyme activity was assayed in l-to d-alanine direction.

かかるアミノ酸残基が各反応において大きく性質の異なる残基であれば、最適 pH において差が生じると考えたが、結果として大差があるものではなかった。

アラニンラーセマーゼの熱に対する安定性は、加熱時間10分間と30分間の条件下で残存活性を測定した、加熱時間が10分間と30分間の時に70℃までは残存活性がほぼ100%であったがそれ以上の温度では酵素失活が温度依存的に確認された (Fig. 7)。

アラニンラーセマーゼの pH に対する安定性は、各 pH 3.0~12.0において処理時間10分間、30分間、60分間と差をつけて測定した (Fig. 8)。pH 6 以下の酸性領域において酵素失活が時間依存的に確認された、しかしながら最も酸性である pH 3.0でも酵素が失活することはなく、60分間処理のものでも10%程度の酵素活性が残存

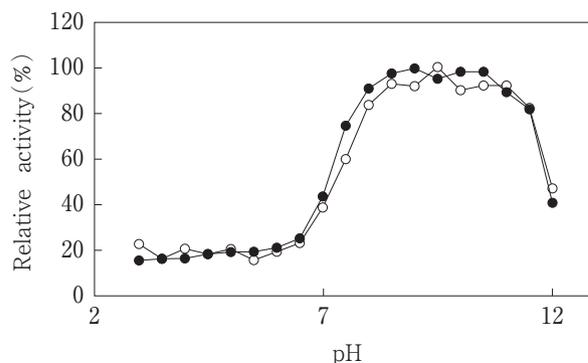


Fig. 6 Optimum pH of alanine racemase from *T. thermophilus* HB8

—○—, Enzyme activity was assayed in d-to l-alanine direction ; —●—, Enzyme activity was assayed in l-to d-alanine direction.

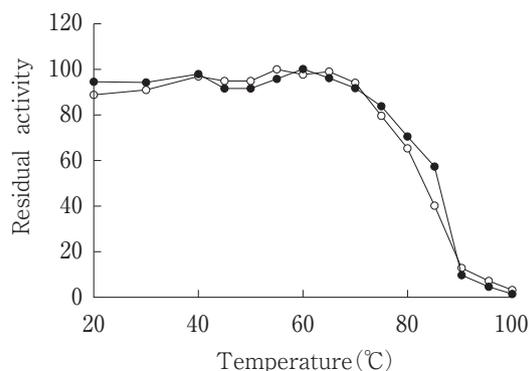


Fig. 7 Thermal stability of alanine racemase from *T. thermophilus* HB8

—○—, Enzyme activity was measured after incubation of the enzyme at various temperatures for 10 min ; —●—, Enzyme activity was measured after incubation of the enzyme at various temperatures for 30 min.

した。

アラニンラセマーゼの基質特異性は、d-アミノ酸オキシターゼの広い基質特異性に依存した方法で測定した (Table. 3)。

近年の報告で *Shigella* 属細菌のモノマー性アラニンラセマーゼにおいて、基質である l-アラニン存在下で分子量が増大し、ダイマー性の挙動を示すことが報告された⁴⁾。本酵素は報告された *Shigella* 属細菌の中の、*S. sonnei* と 28% の同一性を示し N 末端側の活性中心を構成すると予想されるモチーフ^{6,7,8)} がよく保存されていることから、同様の挙動を示す可能性があると考えられた。TSK-GEL SW300 カラムを用いた HPLC ゲル濾過分析によりその挙動を確認した (Fig. 9)。ダイマー性になれば分子量が増大し、19分と16分のピークの間に見られるはずであったが結果としてピークが見られたのは 21分であった。この結果からも本酵素がモノマーであることが示唆された。

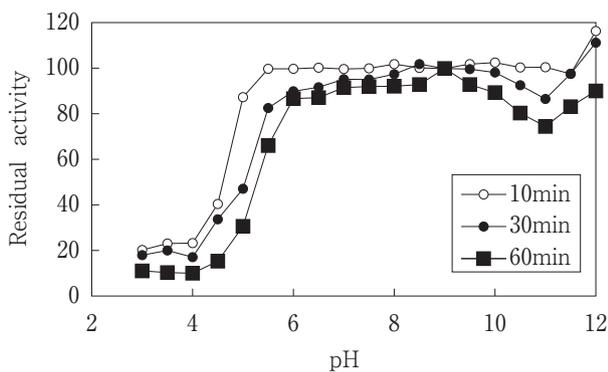


Fig. 8 pH stability of alanine racemase from *T. thermophilus* HB8

—○—, Enzyme activity was measured after incubation of the enzyme at various pH for 10 min ; —●—, Enzyme activity was measured after incubation of the enzyme at various pH for 30 min ; —■—, Enzyme activity was measured after incubation of the enzyme at various pH for 60 min.

Table 3 Substrate specificity of alanine racemase from *T. thermophilus* HB8

	Relative Activity (%)	Racemase Activity (U/mg)
l-Ala	100	604.1
l-Val	0	0
l-Met	0	0
l-Ile	0	0
l-Ser	0	0
l-Arg	0	0
l-His	0	0
l-Thr	0	0

さらにこの結果を裏付けるため、ポジティブコントロールとして *Shigella dysenteriae* 由来アラニンラセマーゼの分子量が増大した同様の条件下で本酵素を 16/60 Superdex 200 pg カラムを用いた FPLC ゲル濾過分析を行った (Fig. 10)。

この結果からも、本酵素は基質存在下、非存在化に関わらずモノマーで存在している可能性が示唆された。現在提唱されているダイマー型アラニンラセマーゼの反応機構において、PLP とシッフ塩基を形成するリジン残基と対になる α -水素を引き抜く残基は、もう一方のサブユニットから供給されるチロシン残基とされている^{6,7)}。 *Shigella* 属細菌由来のアラニンラセマーゼにおいて、基質存在化で分子量の増大が見られたことは、通常はモノマーの状態で存在していても、酵素反応が実際に行われる際には、ダイマー構造を取っている可能性が考えられる。

要 約

高度好熱性細菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来アラニンラセマーゼ遺伝子を大腸菌中にクローニングし、発現させた後に、精製及び性質検討を行った。 *alr* 遺伝子は 1080 bp からなり 360 アミノ酸残基をコードしていたので、本酵素は 38,596 Da の分子量であると予想された。 *alr* 遺伝子の [G + C] 含量は、72% であり、 T_m 値は 98.8°C であった。 *T. thermophilus* HB8 由来アラニンラ

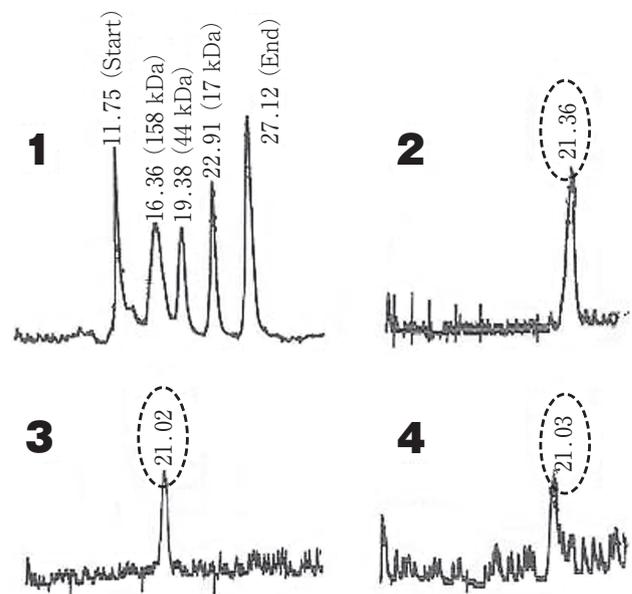


Fig. 9 Gel filtration chromatography of Alanine racemase using HPLC

1, Molecular weight marker ; 2, Alanine racemase ; 3, Alanine racemase with 0.1M l-alanine ; 4, Alanine racemase with 0.1M d-alanine
Content of enzyme is 20 μ g, flow rate is 1 ml/min
Number by each peak indicates retention time (min)

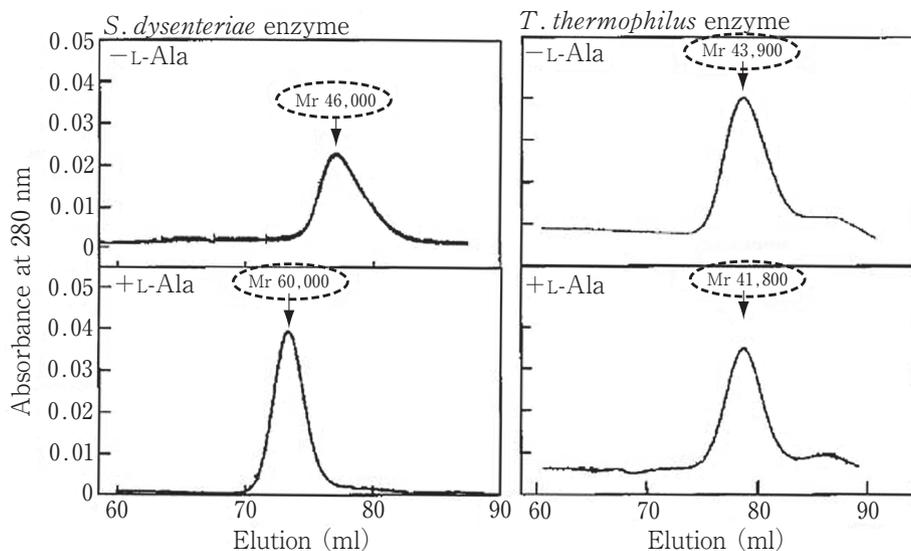


Fig. 10 Gel filtration chromatography of alanine racemase using FPLC. Flow rate is 1 ml/min.

セマーゼを中等度好熱性細菌 *Geobacillus stearothermophilus* 及び赤痢菌 *Shigella sonnei* 由来のアラニンラセマーゼと一次配列の比較をしたところ, *G. stearothermophilus* 由来のものとの33%, 赤痢菌由来の酵素と28%の相同性を示した. *T. thermophilus* HB8 由来アラニンラセマーゼを, 70°Cで10分間の熱処理後, DEAE-トローヨール陰イオン交換カラム等により精製した. 精製酵素の最適温度は, d-アラニンから l-アラニンへの反応で55°C, l-アラニンから d-アラニンへの反応では60°Cであり, 最適pHは, 9.0~10.0であった. また, 70°Cで30分インキュベートを行った後にも, 活性の低下は見受けられず耐熱性を示した. 更に, 本酵素は分子量38,000のモノマー酵素であると推定され, その反応機構に興味を持たれる.

文 献

- 1) Seow, T. K., K. Inagaki, T. Nakamura, R. Maeda, T. Tamura, and H. Tanaka : Purification and Some Characteristics of a Monomeric Alanine Racemase from an Extreme Thermophile, *Thermus thermophilus*. *J. Biosci. Bioeng.*, **90**, 344-346 (2000)
- 2) Shaw, J. P., G. A. Petsko, and D. Ringe : Determination of the Structure of Alanine Racemase from *Bacillus stearothermophilus* at 1.9-Å Resolution. *Biochemistry.*, **36**, 1329-1342 (1997)
- 3) Watanabe, A., T. Yoshimura, B. Mikami, H. Hayashi, H. Kagamiyama, and N. Esaki : Reaction Mechanism of Alanine Racemase from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Biol. Chem.*, **277**, 19166-19172 (2002)
- 4) Yokoigawa, K., R. Hirosawa, H. Ueno, Y. Okubo, S. Umesako, and K. Soda : Gene Cloning and Characterization of Alanine Racemase from *Shigella dysenteriae*, *Shigella boydii*, *Shigella flexneri*, and *Shigella sonnei*. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **288**, 676-684 (2001)
- 5) Inagaki, K., K. Tanizawa, B. Badet, T. Walsh C., H. Tanaka, and K. Soda : Thermostable Alanine Racemase from *Bacillus stearothermophilus* : Molecular Cloning of the Gene, Enzyme Purification, and Characterization. *Biochemistry*, **25**, 3268-3274 (1986)
- 6) Watanabe, A., Y. Kurokawa, T. Yoshimura, T. Kurihara, K. Soda, and N. Esaki : Role of Lysine 39 of Alanine Racemase from *Bacillus stearothermophilus* That Binds Pyridoxal 5'-Phosphate. *J. Biol. Chem.*, **274**, 4189-4194 (1999)
- 7) Watanabe, A., T. Yoshimura, B. Mikami, and N. Esaki : Tyrosine 265 of Alanine Racemase Serves as a Base Abstracting α -Hydrogen from L-Alanine : The counterpart Residue to Lysine 39 Specific to D-Alanine. *J. Biochem.*, **126**, 781-786 (1999)
- 8) Strych, U., and J. Benedik M. : Mutant Analysis that Alanine Racemase from *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* Are Dimeric. *J. Bacteriol.*, **184**, 4321-4325 (2002)

