

好熱性細菌 *Thermus* sp. O-3-1 由来 耐熱性アミダーゼの精製及び性質検討

小林 史明・青峰 弘起・水無 渉^{a)}・湯 不二夫^{a)}
田村 隆・稲垣 賢二
(農芸化学コース)

Purification and Characterization of Thermostable Amidase from *Thermus* sp. O-3-1

Fumiaki Kobayashi, Hiroki Aomine, Wataru Mizunashi^{a)}, Fujio Yu^{a)},
Takashi Tamura, and Kenji Inagaki
(Course of Agrochemical Bioscience)

The gene encoding a thermostable amidase (EC 3.5.1.4) from thermophilic bacterium *Thermus* sp. O-3-1, was cloned and expressed in *Escherichia coli* JM109. The cloned amidase gene (*ami*) is 930 bp and encodes a protein composed of 310 amino acids. The protein is predicted to have a molecular mass of 33,089 Da. The amidase from *Thermus* sp. O-3-1 was purified by heat treatment and DEAE Toyopearl 650M column chromatography. The molecular mass of the native enzyme was estimated to be about 70 kDa by gel filtration chromatography, indicating that the enzyme has a homodimeric structure. The purified enzyme was stable up to 80°C and within a pH range from 7.0 to 10.0. The optimum temperature and pH for enzyme activity were 90°C, and 9.0, respectively. The enzyme was strongly inhibited by the metal-chelating compound EDTA. The activity of the EDTA-treated enzyme was reactivated by the addition of Co²⁺, Ni²⁺ and Mn²⁺ ions. Therefore the enzyme was predicted to be metalloenzyme. Finally, as a result of investigation into substrate specificity, the purified enzyme was suggested to be D-amino acid specific amidase, as it showed higher activity toward D-Leu-pNA than L-Leu-pNA.

Key words : amidase, thermostable enzyme, *Thermus*, D-amino acid specific amidase

緒 言

アミダーゼ (EC 3.5.1.4) はアミド化合物をカルボン酸化合物とアンモニアに加水分解する反応を触媒する酵素であり、全ての生物界に存在している¹⁾。アミダーゼの主な役割としてニトリル系化合物の代謝への関与が知られている。ニトリル系化合物は2つの生化学的代謝によって関連するカルボン酸化合物へと変換される。1つはニトリラーゼ (EC 3.5.5.1) によるニトリルのカルボン酸化合物とアンモニアへの加水分解である。もう1つはニトリルをニトリルヒドラーゼによってアミド化合物に変換し、その後アミダーゼによってカルボン酸化合物とアンモニアに変換する2段階の反応である。これらの経路は有用な化合物を生産するために用いることができる²⁾。例えば *Rhodococcus rhodochrous* J1 由来のニトリルヒドラーゼを用いて、アクリロニトリルからアクリリアミドの生産が行われている³⁾。また、立体選択性を示すいくつかのアミダーゼが報告されており^{4,5,6,7)}、アミノ酸の生産や有用なカルボン酸化合物の生産に用いられている。

これまでに細菌等の微生物由来のアミダーゼが盛んに研究されており、それぞれのアミダーゼはそれぞれ性質が異なっている。例えばアミノ酸アミドに対して反応するもの、アセトアミドやプロピオンアミド等の脂肪族アミドに反応するもの、立体選択性の高いものなど様々である。そのほかサブユニット構造も単量体から十量体まで様々であり、ほとんどのアミダーゼが何らかの金属を持つ金属酵素である。またアミド加水分解反応のほか、アシル転移反応も触媒することが報告されており^{8,9)}、アミダーゼは多様な化合物の生産に有用であると考えられる。このような特徴からアミダーゼは医薬、農薬、食品等に有用なカルボン酸化合物やアミノ酸の生産に用いられており、商業的、工業的に非常に有用な酵素とされている。

Received October 1, 2011

a) (株)三菱レイヨン
(Mitsubishi Rayon Co., Ltd.)

今回、我々はアミド化合物を唯一の窒素源として培地に添加することで、アミド加水分解酵素を生産する55℃以上で生育可能な *Thermus* 属の微生物を見出し *Thermus* sp. O-3-1 と命名した。 *Thermus* 属の微生物は耐熱性の酵素を持つことで知られており、酵素の耐熱性は工業的利用のための重要な因子と考えられる。

本研究では発見した高度好熱性細菌 *Thermus* sp. O-3-1 からアミダーゼ遺伝子を探索、取得し、大腸菌にて組み換えタンパク質として発現させ、精製及び性質検討を行うことにより、 *Thermus* sp. O-3-1 由来アミダーゼの工業的利用への可能性を視野に入れた有用性の有無を見出すことを目的とした。

材料と方法

使用菌株、プラスミド

目的タンパク質発現用の宿主としては、 *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。またプラスミドベクターには pTrc99A を使用した。

アミダーゼ遺伝子のクローニング

岐阜県の温泉水より各種アミド化合物を唯一窒素源とし、アミド加水分解酵素を生産する55℃以上で生育可能な *Thermus* 属の微生物を見出し *Thermus* sp. O-3-1 と命名した。この菌からゲノム DNA の調製を行い、DNA ライブラリを作製した。作成した形質転換体を乳酸アミド含有寒天培地に接種し、アミダーゼ遺伝子を含む菌体をスクリーニングした。得られたアミダーゼ遺伝子の情報を基に DNA プライマーを作成し、pTrc99A の *Nco* I, *Pst* I サイトにアミダーゼ遺伝子を繋ぎ込むことによって、発現プラスミド pTrc-*ami* を作成した。また DNA シーケンサーによりアミダーゼ遺伝子の塩基配列を決定した (DDBJ アクセッション番号: AB673448 に登録)。

Thermus 由来アミダーゼ遺伝子の発現と酵素精製

発現プラスミド pTrc-*ami* で形質転換した *E. coli* JM109 を 50 μ g/mL のアンピシリンを含む 5 mL の LB 培地に植菌し、37℃で一晩培養し、これを前培養とした。その後、50 μ g/mL のアンピシリンを含む 2 L の TB 培地に前培養液を 1/100 量添加し、37℃で 4 時間培養した後、終濃度 1 mM となるように IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactoside) を加え、さらに 14 時間培養を行った。6,000 rpm, 20 分間で集菌した菌体ペレットを湿菌体重量の 2 倍量の 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に懸濁し、150 W, 15 分間 \times 2 回で超音波破碎した。この破碎液を 10,000 rpm, 20 分間で遠心分離し、沈殿物を除く上清を無細胞抽出液とした。無細胞抽出液を 80℃, 30 分間で熱処理し、10,000 rpm, 20 分間で遠心分離し、沈殿物を除く上清を熱処理画分とした。熱処理画分を 50 mM Tris-

HCl (pH 8.0) で透析し、DEAE-トヨパール650 M イオン交換カラム (東ソー) を用いて精製を行った。酵素の溶出には 100 mM 塩化カリウムを含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) を用いたステップワイズ法にて溶出させた。DEAE 画分を 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) で透析し、10% 飽和となるように硫酸アンモニウムを添加し、懸濁した。その後、フェニールトヨパール650 M カラムを用いて精製を行った。カラムの平衡化には 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10% 飽和硫酸アンモニウムを使用し、酵素の溶出は 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) を用いたステップワイズ法で行った。最後にセファクリル S-300 HR ゲル濾過カラムを用いて精製を行った。酵素液を 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) で透析した後、カラムにアプライし、同じく 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) で流速 1 mL/min で流し続け、アミダーゼ活性を持つ活性画分を回収し、ゲル濾過画分とした。

酵素活性測定法

アミダーゼの活性測定は、アミノ酸誘導体であるアミノアシルパラニトロアニリド (アミノアシル-pNA) を基質として用いて行った。酵素がアミノアシル-pNA を加水分解した際に遊離する pNA を吸光度 405 nm で測定した。本実験では、主に L-Leu-pNA を用いた。2 mM L-Leu-pNA を含む 100 mM Tris-HCl (pH 9.0) 溶液に酵素サンプルを加え、反応を開始、80℃にて反応を行い、その後、0~0.1 mM の範囲で作製した pNA 検量線を用いて吸光度 405 nm の増加量から酵素活性を算出した。1 unit (U) は、1 分間に 1 μ mol の pNA を生産する酵素量とした。

酵素の諸性質の検討

最適反応温度は、各温度にて反応液を 5 分間ブレインキュベートし、そこに酵素サンプルを添加して測定した。熱安定性は、酵素を各温度にて 30 分間処理した後 80℃にて活性測定を行い求めた。最適反応 pH は、活性測定法の 100 mM Tris-HCl (pH 9.0) を 20 mM ブリトン・ロビンソン広域緩衝液 (pH 3.0~12.0) に変えて行った。pH 安定性は、酵素サンプルを各 pH の 20 mM ブリトン・ロビンソン広域緩衝液 (pH 3.0~12.0) で透析して置換した後、30 分間処理し、その後、2 mM L-Leu-pNA を含む 100 mM Tris-HCl (pH 9.0) 溶液に酵素サンプルを加え、活性を測定した。

各種金属の添加によるアポ酵素への影響検討

酵素に終濃度 5 mM となるように EDTA を加え、80℃で 60 分間保温した。その後、50 mM Tris-HCl (pH 8.0) で 2 時間 \times 2 回透析を行うことで遊離 EDTA を除去した。これを金属が外れたアポ酵素とし各種金属 (CoCl₂, NiCl₂, MnCl₂, CaCl₂, MgCl₂, ZnSO₄, FeSO₄, CuSO₄) をそれぞれ 5 mM となるように酵素に添加した。金属を添加した酵素を 37℃と、80℃の 2 つの温度で 1 時間保温した。その後、遠心 (14,000 rpm, 5 分間) して上清を回収し、50 mM Tris-HCl (pH 8.0) で 2 時間 \times 2 回透析する

ことで遊離金属を除去した。これを金属処理酵素として活性測定とタンパク質濃度定量を行い、比活性を算出して活性の変化を観察した。

アミダーゼの基質特異性の検討

Gly-pNA, L-Leu-pNA, D-Leu-pNA, D-Ala-pNA について基質特異性の検討をした。2 mM 各種 pNA 基質, 100 mM Tris-HCl (pH 9.0) 混合液 (Gly-pNA は, pH 9.0 で析出するため pH 8.0で行った) に酵素を加え反応を開始した。最適温度である80℃で適当な時間反応を行い、その後、0~0.1 mM pNA 検量線を用いて吸光度405 nmの増加量から酵素活性を算出した。

結果と考察

Thermus 由来耐熱性アミダーゼ遺伝子のクローニング

アミダーゼ遺伝子を大腸菌内にクローニングし, DNA シーケンスを行った。その結果, 930 bp からなる open reading frame (ORF) を同定した。この ORF は, 310 アミノ酸をコードし, 分子量が33, 089であることが推測された (Fig. 1)。

Thermus 由来耐熱性アミダーゼの精製

熱処理と DEAE-トヨパール, フェニルトヨパール及

びセファクリル S-300 HR の各クロマトグラフィーにより, 比活性で約15倍にまで精製することができ, SDS-PAGE の結果, ほぼ単一まで精製することができた (Table 1, Fig. 2)。また, ゲル濾過クロマトグラフィー及び SDS-PAGE の結果から, 本酵素が分子質量33 kDa のサブユニット 2 分子からなるダイマー構造を有していることが明らかとなった。

耐熱性アミダーゼの諸性質の検討

精製酵素の反応最適温度, 熱安定性, 最適 pH, pH 安定性について調べた。その結果, 反応最適温度は90℃, 熱安定性は80℃まで (Fig. 3), 最適 pH は9.0, pH 安定性は7.0~10.0であった (Fig. 4)。好熱性細菌由来の酵素の特徴を有し, 熱に安定な耐熱性酵素であることが示された。酵素の工業的利用において耐熱性は重要な因子と考えられる。他種由来のアミダーゼでは, *Ochrobacterium anthropi* NCIMB 40321由来アミダーゼが60℃, 1時間の熱処理で100%の活性を維持⁵⁾, *Sulfolobus tokodaii* 7由来アミダーゼは75℃, 2時間の熱処理で100%の活性を維持と報告されている⁶⁾。また本酵素は, pH に対しても比較的安定な酵素であった。

```

1 ATGAAGGGCTACAGGACCATTCATCGGGAGCATCACCACTTCGGCTGGGATAATGGAAGTGCACCCCGGTAGCCAGGGTATTTCCGGAGAGGTGGTGGAAAT
  M K G Y R T I H R E H H H E G W D N G L P P V A R V E F P G E V V E F
101 TCGAGGTGGTGGACGCTCTGGAGGSCAGCTGACGCCGGTGCACCCGCTGAAGACGTGGCTCGTCTGGACTTCGCCCCGGTAAACCCGGTCAAGGGTCCC
  E V V D A S G G Q L T P G A T A E D V A R L D F A R V N P V T G P V
201 GTGCTGGTGGACGGGCTGAGCCGGGGATGCCCTGGTGGTGGAGTGGTGGGCTCGAGGGGTCGGGTGGGGCTGGACGCCCATCATCCCCGGGTTTGG
  L V D G A E P G D A L V V E V V G L E G S G W G W T A I I P F G F G L
301 GCTGTGGCGGAAGACTTCCAAATCCGCACTTGCACCTTTTCGCAATACCACTTGGTGGCGTGGAGTTCCTACCTGGAGTCCGGTACCGTACAGGCCTT
  L A E D F P N P H L H F S Q Y H L G G V E F L P G V R L P Y R E F P
401 TCCCCGGCACCATCGGCTGGCTCCTGCGGCCCTGGGGTGCACCTCCGTGGTCCACCGCGGAGGTGGGAGGCAACCTGGACATCCCGCACCTGGTGGAA
  G T I G V A P A A P G V H S V V P P R E V G G N L D I R D L V E G
501 GGGGCGAGACTCTTCTCCGGTGCAGGTGCGGGGGCCCTGTCTCTGTGGGCGACACCCACGCCGTTTCCAGGGGACGGCGAGGTGTGGCACCCGAGT
  A R L E L P V Q V P G A L F S V G D T H A V Q G D G E V C G T A V E
601 GGAGTCACCCATCGGCTCGCCCTACGTTTGGACCTGCGCAAGSAGGCCAGGATACCGCGCCCGGCTTTTGAAGTCCCACGCGGATCAGCAAAAGTTCACG
  S P M R I A L R F D L R K E A R I P R P A F E V P R G S A K V P G E
701 GGGAGAGAGGCTTTTTTCCACCCAGGGATTGCTCCGGACCTTATGCTTCCGCGCAAGGATGCGGTACGCTACATGATCGACCACCTAGGGCGGGAGTAT
  R G F F A T T G I A P D L M L A A K D A V R Y M I D H L G R E Y G
801 GGGCTATCCCCGGAAGGCGTACATGCTCTGCAGCTGGCAGTGGACCTAAGAATCAGCGAGGTGGTGGATGCCCCCAACTGGGTGGTTCGCGCTTACCT
  L S E E K A Y M L C S V A V D L R I S E V V D A P N W V V S A Y L
901 ACCCGTGGATATTTTCGCTGA
  P V D I F A *
    
```

Fig. 1 DNA sequence and deduced amino acid sequence of amidase gene from *Thermus* sp. O-3-1.

Table 1 Purification of amidase from *Thermus* sp. O-3-1

	Total protein (mg)	Total activity (mU)	Specific activity (mU/mg)	Purification index (fold)	Yield (%)
Cell free extract	2000	5800	2.9	1.0	100
Heat treatment	320	8500	26	9.1	150
DEAE-Toyoparl	110	3200	35	12	68
Pheny-Toyoparl	40	1900	48	17	33
Sephacryl S-300	7.0	290	42	15	5.0

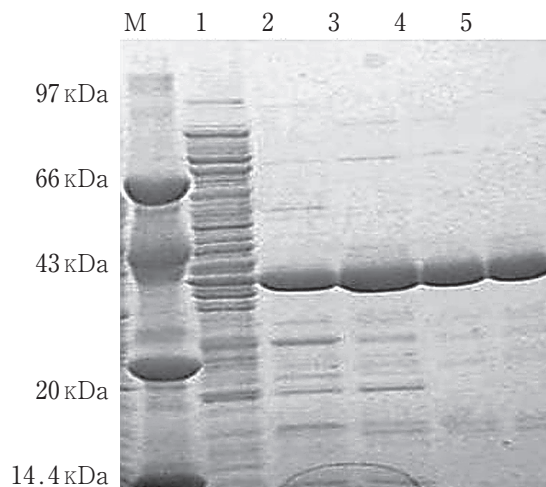


Fig. 2 SDS-PAGE of amidase from *Thermus* sp. O-3-1 at different stages of purification.

Ten micrograms of samples were loaded on a 10% acrylamide gel. Lane M, molecular mass markers; phosphorylase b (97.0 kDa), albumin (66.0 kDa), ovalbumin (43.0 kDa), trypsin inhibitor (20.1 kDa), α -lactalbumin (14.4 kDa); lane 1, cell free extract of *E. coli* JM109 transformants; lane 2, after heat treatment for 30 min at 80°C; lane 3, after DEAE Toyopearl column chromatography; lane 4, after Phenyl-Toyopearl column chromatography; lane 5, after Sephacryl S-300 column chromatography.

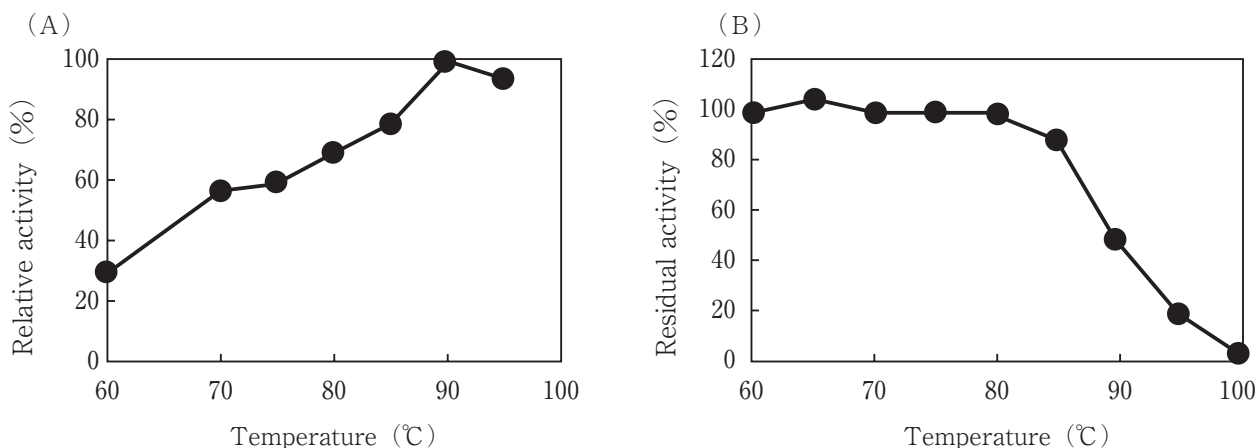


Fig. 3 Effect of temperature on activity and stability of amidase from *Thermus* sp. O-3-1.

(A) Optimum temperature of the amidase from *Thermus* sp. O-3-1.

(B) Thermal stability of amidase from *Thermus* sp. O-3-1. Enzyme activity was measured after incubation of enzyme at various temperatures for 30 min.

各種金属の添加による酵素への影響検討

金属キレート剤である EDTA を加えて 37°C で保温することにより活性が約 10% に低下, また 80°C で保温することにより活性がほとんどなくなった. このことから本酵素は活性中心に金属を有する金属酵素であることが示唆された. アミダーゼの多くは金属が活性に関与する金属酵素であることが知られており, 含有している金属は Ba^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Cr^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} など多種にわたる. 例えば *Bacillus halodurans* 由来アミダーゼ (PDB ID: 2III1) では Ca^{2+} イオンがまた *Thermotoga martima* 由来アミダーゼ (PDB ID: 2F4L) では Zn^{2+} イ

オンが 2 個活性中心に認められる.

次にこの EDTA 処理酵素に各種金属イオンを添加し, 活性がどのように変化するかを実験した結果, Co^{2+} を添加することで活性が EDTA 未処理酵素の約 200~400% になった. また, Ni^{2+} , Mn^{2+} を添加しても活性が回復した. さらに, 37°C よりも 80°C で金属処理することによって活性の回復がより顕著になった (Fig. 5). 金属の種類によって活性が変化するのは, 金属イオンの種類によって原子の大きさやイオン強度が異なり, これらが酵素の活性中心周辺の静電的, 立体構造的な環境に変化を与えるためではないかと考えられた. また高温条件化で

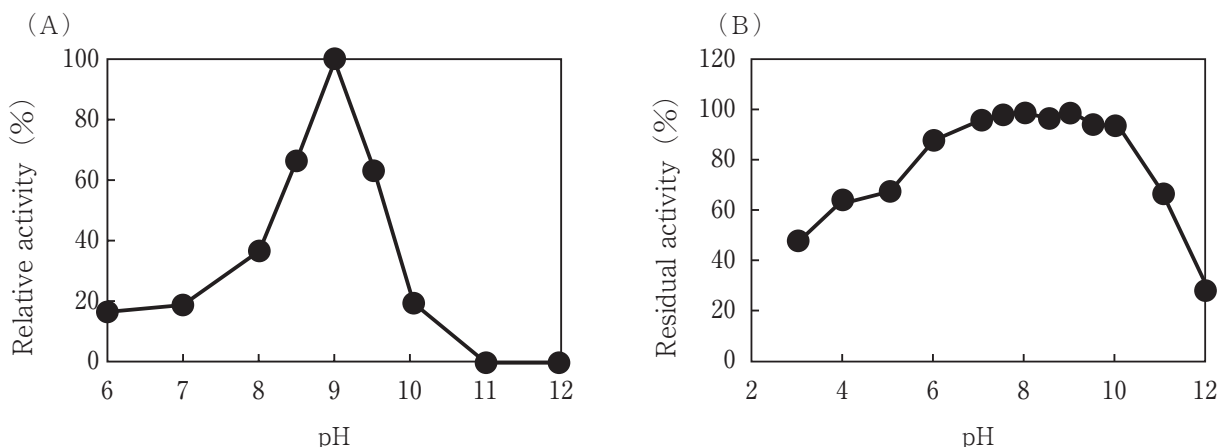


Fig. 4 Effect of pH on activity and stability of amidase from *Thermus sp.* O-3-1.

(A) Optimum pH of amidase from *Thermus sp.* O-3-1. Enzyme activity was measured in the Britton-Robinson buffer.

(B) pH stability of amidase from *Thermus sp.* O-3-1.

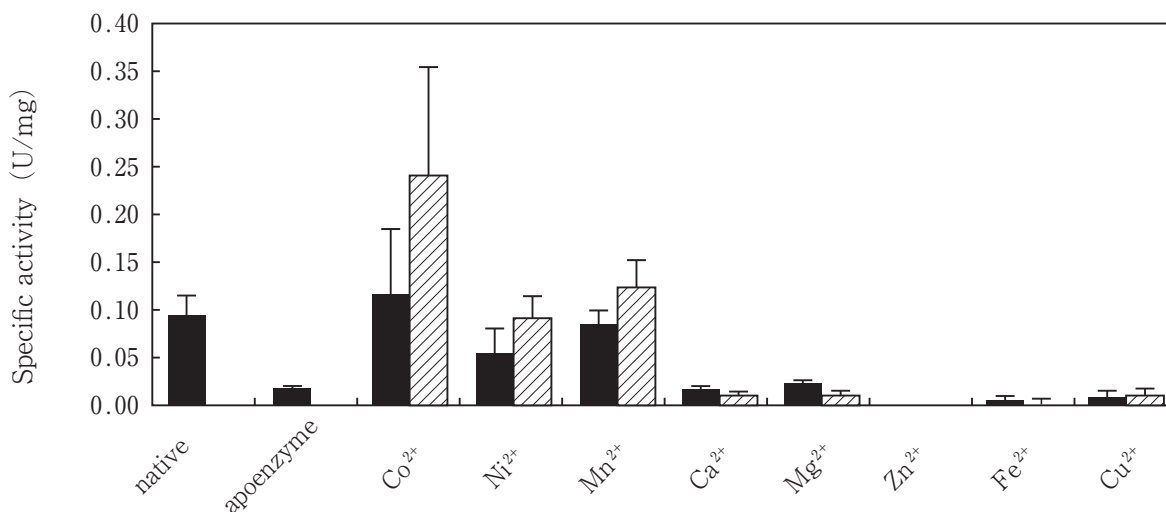


Fig. 5 Effect of various metal ions toward amidase from *Thermus sp.* O-3-1.

Enzyme was treated with a final concentration of 5 mM EDTA at 80°C, and incubated for 60 min. Thereafter, a final concentration of 5 mM various metal ions was added toward the EDTA-treated enzyme at 37°C (■) or 80°C (▨), and incubated for 60 min. All assays were performed at a final substrate concentration of 2.0 mM L-Leu-pNA at 80°C. All data are expressed as the mean \pm standard deviation of three independent experiments.

の金属処理でより活性が高まるのは、高温下に酵素を置くことで、構造が揺らぎ、活性中心周辺の空間が広がり、金属が入りやすくなるからではないかと考えられた。以上の結果から酵素発現時の培地への金属の添加や酵素自体への金属の添加が、より強い活性を持つ酵素の生産に繋がる可能性が示唆された。

Thermus 由来耐熱性アミダーゼの基質特異性の検討

基質特異性を4種類のpNA基質を用いて検討した。その結果、D-Leu-pNAに対して高い反応性が見られた。これは当初使っていたL-Leu-pNAの約10倍ほどであった (Fig. 6)。さらに速度論解析を行った結果、 k_{cat}/K_m

からD-Leu-pNAが本酵素に対して最もよい基質であることが分かった (Table 2)。D-アミノ酸アミドに反応するアミダーゼとしては *Brevibacterium iodinum* 由来アミダーゼや *Brevibacillus borstelensis* BCS-1 由来アラニンアミダーゼ等が報告されており、これらに特徴的なのは高い立体選択性を持っているということである^{4, 10}。本酵素においてはD-Leu-pNAに対して特異性が高いことが分かったが、L-Leu-pNAにも反応する酵素であった。今後より多くの基質に対する活性を調べ、立体選択性の機構の解析が必要となる。金属酵素の活性中心にある金属イオンを別のイオンに変えると基質特異性が変わ

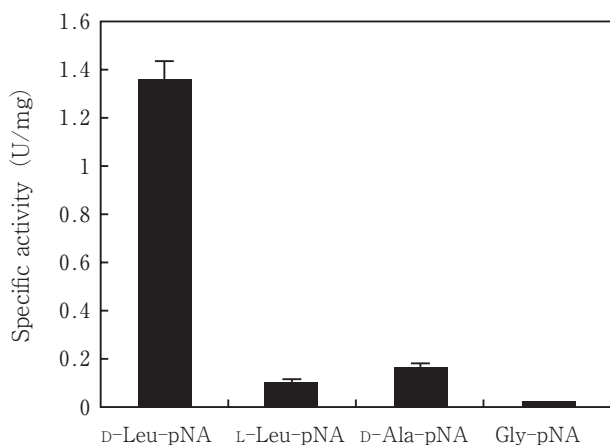


Fig. 6 Hydrolytic activity of amidase from *Thermus* sp. O-3-1 toward D-Leu-pNA, L-Leu-pNA, D-Ala-pNA, and Gly-pNA. All assays were performed at a final substrate concentration of 2.0 mM. All data are expressed as the mean \pm standard deviation of three independent experiments.

Table 2 Enzyme kinetics of amidase from *Thermus* sp. O-3-1

	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($s^{-1} \cdot mM^{-1}$)
D-Leu-pNA	3.7	2.5	0.68
L-Leu-pNA	1.2	0.096	0.083
D-Ala-pNA	1.5	0.12	0.082
Gly-pNA	0.29	0.011	0.037

K_m and k_{cat} values were calculated from a non-linear regression fit to the Michaelis-Menten equation using initial estimates from double-reciprocal plots.

ったという報告もなされており¹¹⁾, 金属酵素における含有金属の同定, 触媒関与のメカニズムを知ることは重要であるため, 今後は立体構造や含有金属の決定が期待される。

要 約

好熱性細菌 *Thermus* sp. O-3-1 由来の耐熱性アミダーゼ遺伝子を大腸菌中にクローニングし, その塩基配列を決定した。ami 遺伝子は 930 bp からなり, 310 アミノ酸をコードしていた。本酵素の分子量は 33, 089 Da であると予想された。 *Thermus* sp. O-3-1 由来アミダーゼを大腸菌で生産させ, 熱処理と DEAE-トヨパール 650M 陰イオン交換カラム等により精製した。ゲル濾過クロマトグラフィーと SDS-PAGE の結果から本酵素は分子量 33 kDa のサブユニット 2 分子からなるダイマー構造を有していることが明らかとなった。精製酵素の熱安定性は 80°C まで, pH 安定性は 7.0~10.0 であり, 安定性の高い酵素であった。最適温度は 90°C, 最適 pH は 9.0 であった。EDTA により活性が著しく阻害され, Co^{2+} や Ni^{2+} ,

Mn^{2+} によって活性の回復, 向上が見られたため, 本酵素は金属酵素であることが示唆された。基質特異性の検討の結果, L-Leu-pNA よりも D-Leu-pNA に対して高い活性を示したため, 本酵素が D-アミノ酸基質に特異性を持つアミダーゼであることが判明した。本酵素は耐熱性を有するユニークな D-アミノ酸アミダーゼであり, 今後産業利用が期待される。

文 献

- 1) Fournand, D. and A. Arnaud : Aliphatic and enantioselective amidases: from hydrolysis to acyl transfer activity. J. Appl. Microbiol., **91**, 381-393 (2001)
- 2) Lawrence, M. C., J. M. Wilczek, and R. D. Fallon : Purification and Characterization of an Enantioselective Amidase from *Pseudomonas chlororaphis* B23. Appl. Environ. Microbiol., **61**, 998-1003 (1995)
- 3) Kobayashi, M., H. Komeda, T. Nagasawa, M. Nishiyama, S. Horinouchi, T. Beppu, H. Yamada, and S. Shimizu : Amidase coupled with low-molecular-mass nitrile hydratase from *Rhodococcus rhodochromus* J1. Eur. J. Biochem., **217**, 327-336 (1993)
- 4) Komeda, H. and Y. Asano : A novel D-stereoselective amino acid amidase from *Brevibacterium iodinum* : Gene cloning, expression and characterization. Enzyme Microb. Technol., **43**, 276-283 (2008)
- 5) Sonke, T., S. Ernste, R. F. Tandler, B. Kaptein, W. P. H. Peeters, F. B. J. van Assema, M. G. Wubbolts, and H. E. Schoemaker : L-Selective Amidase with Extremely Broad Substrate Specificity from *Ochrobactrum anthropi* NCIMB 40321. Appl. Environ. Microbiol., **71**, 7961-7973 (2005)
- 6) Suzuki, Y. and H. Ohta : Identification of a thermostable and enantioselective amidase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii* strain 7. Protein Expression and Purification., **45**, 368-373 (2003)
- 7) Mohamed, S. N., A. A. Khan, J. E. Seng, J. E. Leakey, P. H. Siitonen, and C. E. Cerniglia : Purification and Characterization of an Amidase from an Acrylamide-Degrading *Rhodococcus* sp.. Appl. Environ. Microbiol., **60**, 3343-3348 (1994)
- 8) Fournand, D., F. Bigey, and A. Arnaud : Acyl Transfer Activity of an Amidase from *Rhodococcus* sp. Strain R 312 : Formation of a Wide Range of Hydroxamic Acids. Appl. Environ. Microbiol., **64**, 2844-2852 (1998)
- 9) Fournand, D., A. Arnaud, and P. Galzy : Study of the acyl transfer activity of a recombinant amidase overproduced in an *E. coli* strain. Application for short-chain hydroxamic acid and acid hydrazide synthesis. J. Mol. Catal., **4**, 77-90 (1998)
- 10) Beak, D. H., S. J. Kwon, S. P. Hong, M. S. Kwak, M. H. Lee, J. J. Song, S. G. Lee, K. H. Yoon, and M. H. Sung : Characterization of a thermostable D-stereospecific alanine amidase from *Brevibacillus borstelensis* BCS-1. Appl. Environ. Microbiol., **69**, 980-986 (2003)
- 11) Arima, J., Y. Uesugi, and T. Hatanaka : *Bacillus* D-stereospecific metallo-amidohydrolase : Active-site metal-ion substitution changes substrate specificity. J. Biochimie, **91**, 568-576 (2009)