

α -아밀라제 페밀리



이 상 필

<산업기술정보원 생명과학실 책임연구원>

I. 序 論

澱粉은 食品素材로서 가장 익숙한 것으로서 글루코스만으로 구성되어 있는 多糖類이고 그 構造內에는 α -1, 4-結合과 α -1, 6-結合이 함유되어 있다. 澱粉중에 존재하는 糖鎖의 가수분해나 합성에 관여하는 반응은 아래와 같은 4종류로 분류할 수 있다.

- ① α -1, 4-글루코사이드 結合의 加水分解
- ② α -1, 6-글루코사이드 結合의 加水分解
- ③ α -1, 4-글루코사이드의 轉移
- ④ α -1, 6-글루코사이드의 轉移

이상과 같은 4종류의 反應 및 이에 관여하는 酵素의 분류는 지금까지 명확하게 구분되어 있었고 독자적인 反應系로서 생각되어져 왔었다. 그러나 최근 이들 酵素 가운데에는 複數의 반응을 촉매할 수 있는 酵素들이 보고되고 있다. 예를들면 日本의 大阪大學 應用生物工學科 今中研究室에서 네오폴루라나제(Neopullulanase)를 自然系로부터 분리하여, 이들 4종류의 反應을 단지 하나의 活性中心에서 촉매할 수 있다는 것을 증명하여 관심을 모으고 있다. 또한, 蛋白質工學的인 방법에 의해 아미노산을 치환시킴으로써 이들 酵素群을 하나의 α -아밀라제 페밀리로서 이해하는 것이 합리적이라고 제안하였다.

본문에서는 먼저 糖質關聯酵素의 분류에 대해 간단히 다루어 본 후, 이들 加水分解酵素 및 糖轉移酵素의 觸媒機構는 기본적으로는 동일한 것이며 이들 酵素群은 相互變換이 가능한 것이라는 관점에서 서술하고자 한다.

II. 澱粉 및 澱粉에 작용하는 酵素의 分類

澱粉은 그 起源에 따라서 다르지만 일반적으로 70~80%의 아밀로펙틴(Amylopectin)과 아밀로

目 次

- I. 序 論
- II. 澱粉 및 澱粉에 작용하는 酵素의 分類
- III. 아밀라제와 關聯酵素의 構造와 機能
- IV. α -아밀라제 페밀리의 提案
- V. 結 論

α -아밀라제는 α -아노머(Anomer)型的 올리고糖을 생성하고 基質을 크게 절단하는 液化型和 低分子의 生成物을 생산하는 糖化型으로 나눌 수 있다. 엄밀하게 이야기하면 그 반응을 결코 無作爲的이지 않고 起源에 따라서 올리고糖에 대한 作用樣式에는 일정한 규칙성이 있다. 최근 澱粉 등과 같은 基質의 非還元性 末端에서부터 엑소(Exo)型으로 작용해 α -아노머의 올리고糖을 생성하는 酵素가 다수 발견되고 있다. 이들은 종래의 α -아밀라제 분류의 범주에 들어가지 않기 때문에 아밀라제의 분류 및 명명법은 새로운 견지에서 재검토할 필요가 있다.

β -아밀라제는 澱粉 등의 非還元性 末端으로부터 2번째의 α -글리코사이드結合에 순차적으로 작용해 β -말토스를 생성하는 엑소型的 아밀라제이다. 글루코아밀라제와 함께 전형적인 糖化型 아밀라제이지만 分枝點(α -1, 6-글루코사이드結合)이 가까운 곳에서는 加水分解속도가 급속하게 감소하고 分枝點으로부터 글루코스 單位 2~3개 전에 反應이 정지해 버리기 때문에, 이른바 β -리미트덱스트린(β -limit dextrin)이 생기게 된다.

글루코아밀라제와 α -글루코시다제는 非還元性 末端으로부터 엑소型으로 작용해 글루코스를 생성하지만 前者의 경우 β -글루코스를 後者の 경우는 α -글루코스를 생성한다는 것이 명확히 다른 점이다. 또한, 일반적으로 글루코아밀라제는 비교적 高分子基質에, α -글루코시다제는 低分子基質에 작용하기 쉽다.

풀루라나제(Pullulanase)와 이소아밀라제는 통상적으로 디브랜칭酵素(Debranching enzyme)라고 불려진다. 풀루라나제는 아밀로펙틴에 대해서 비교적 외부에 존재하는 α -1, 6-글루코사이드結合에만 작용하지만 이소아밀라제는 α -1, 6-글루코사이드結合을 거의 완전하게 분해시킬 수 있다. 또한, 前者는 풀루란(Pullulan)을 분해시키지만 後者는 거의 작용하지 못한다. 分枝올리고糖에 대한 작

용도 달라 풀루라나제 쪽이 보다 많은 종류의 分枝 올리고糖을 분해할 수 있다.

풀루란은 말토트리오스(Maltotriose)가 α -1, 6-글루코사이드結合으로 연결된 규칙적인 구조를 가진 多糖類이고 이를 분해하는 酵素는 다음과 같다.

① 非還元性 末端을 글루코스 單位로 분해하는 글루코아밀라제

② α -1, 6-글루코사이드結合을 분해해 말토트리오스를 생성하는 풀루라나제

③ α -1, 4-글루코사이드結合을 분해해 이소파노스(Isopanose)를 생성하는 이소풀루라나제(EC 3, 2, 1, 57)

④ α -1, 4-글루코사이드結合을 분해해 파노스(Panose)를 생성하는 네오프루라나제

이상과 같은 4종류의 酵素중 풀루란으로부터 주로 파노스를 생성하는 4번째 타입의 酵素는 *Thermoactinomyces vulgaris*에서 생성된 것이 보고되어 있지만 이 酵素는 주로 澱粉에 작용하는 糖化型 α -아밀라제의 일종이다. 이에 반해 네오프루라나제는 풀루란에는 잘 작용하지만 澱粉에는 그다지 작용하지 않는다는 점에서 α -아밀라제와 명확하게 다르다. 最終分解率은 풀루란을 基質로 사용한 경우가 45% 정도인데 비해 澱粉의 경우 약 13%였다.

澱粉의 加水分解反應을 주로 촉매하는 아밀라제 등에 대해 α -1, 4-글루코사이드 轉移反應을 주로 촉매하는 酵素로서 사이클로덱스트린 글루카노 트랜스퍼라제(CGTase : EC 2.4.1.19)가 있다. 이 酵素는 3가지의 反應 즉, 環化(Cyclization), 環開裂(Decyclization) 및 轉移(Transference), 不均化(Disproportionation)를 觸媒하는 것으로 알려져 있다. 이외의 轉移酵素로서는 D-酵素(EC 2.4.1.25)(Amylomaltase : EC 2.4.1.25)가 있다. 이것을 CGTase와는 달리 分子內轉移에 의한 環化反應을 촉매하지 않는 점이 다르다. 또한, α -1, 6-글루코사이드 轉移反應을 觸媒하는 酵素로서는 브랜칭

酵素(Branching enzyme : EC 2.4.1.18)가 있다.

이외의 주요한 關聯酵素로서는 글루코스를 푸락토스로 異性化시키는 데 쓰여지는 글루코스 아이소머라제(자일로스 아이소머라제 : EC 5.3.1.5)나 맥스트로스 아이소머라제(EC 2.4.1.2) 등이 있다.

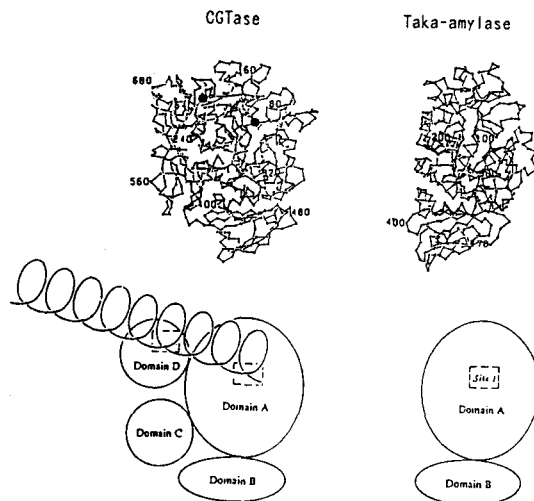
III. 아밀라제와 關聯酵素의 構造와 機能

타카아밀라제 A는 *Aspergillus oryzae*가 생산하는 酵素인데 構造解析이 가장 진전되어 있는 α -아밀라제이다. 이 酵素는 478개의 아미노산으로 구성되어 있는 分子量 53000의 糖蛋白質이고 N末端으로부터 197번째의 Asn이 糖鎖에 의해 修飾되어 있다. 그 立體構造는 松浦 등에 의해 규명되어 있는데 糖質關聯酵素의 연구에 있어서 중요한 지침이 되고 있다.

이 酵素는 [圖 2]에 나타나 있는 것과 같이 두 개의 도메인(Domain)으로 되어 있다. N末端쪽의 A 도메인(약 380개의 아미노산)은 活性中心을 포함하고 있고 基質과 결합하기 위한 크레프트

(Craft)도 가지고 있는 것으로 밝혀졌다. 또한 活性發現에 필수적인 칼슘도 이 크레프트의 安定化에 기여하고 있는 것으로 밝혀져 있으나 C末端쪽의 B 도메인(약 100개의 아미노산)의 역할에 대해서는 아직 불명확하다.

한편, 澱粉을 분해해서 사이클로덱스트린을 합성하는 酵素인 CGTase에 대해서는 日本의 久保田 등과 獨逸의 Klein 등이 각각 그 立體構造를 발표하였다. 久保田 등의 결과에 의하면 이 酵素는 4개의 도메인으로 구성되어 있고 N末端으로부터 가까운 2개의 도메인인 A, B는 α -아밀라제가 가지고 있는 2개의 도메인과 유사하다. 실제로 CGTase가 澱粉으로부터 사이클로덱스트린을 생성하는 경우 먼저 澱粉의 α -1, 4-글루코사이드結合을 절단하는데, 이것은 아밀라제의 加水分解反應과 매우 유사하기 때문에 아밀라제와 마찬가지로의 活性部位가 CGTase의 N末端에 존재한다는 것이 당연한 것으로 받아들여지고 있다. 또한, D 도메인에 존재하는 제2의 基質結合部位에 의해 糖轉移活性이 강화된다는 것도 이미 밝혀져 있다.



[圖 2] 타카아밀라제와 CGTase의 立體構造

다음은 지금까지 규명된 糖質關聯酵素들의 아미노酸序列을 비교해보고자 한다. α -아밀라제, 네오플루라나제, 이소아밀라제, 플루라나제, CGTase, 브랜칭酵素, 말타아제(α -글루코시다제) 및 올리고-1, 6-글루코시다제의 一次構造를 보면, α -아밀라제에서 이미 규명되어 있는 相同性이 높은 4개의 保存領域이 이들 酵素에도 존재한다는 것을 알 수 있다[圖 3]. 한편, 이들 4개의 保存領域 이외에서는 相同性이 거의 인정되지 않았다.

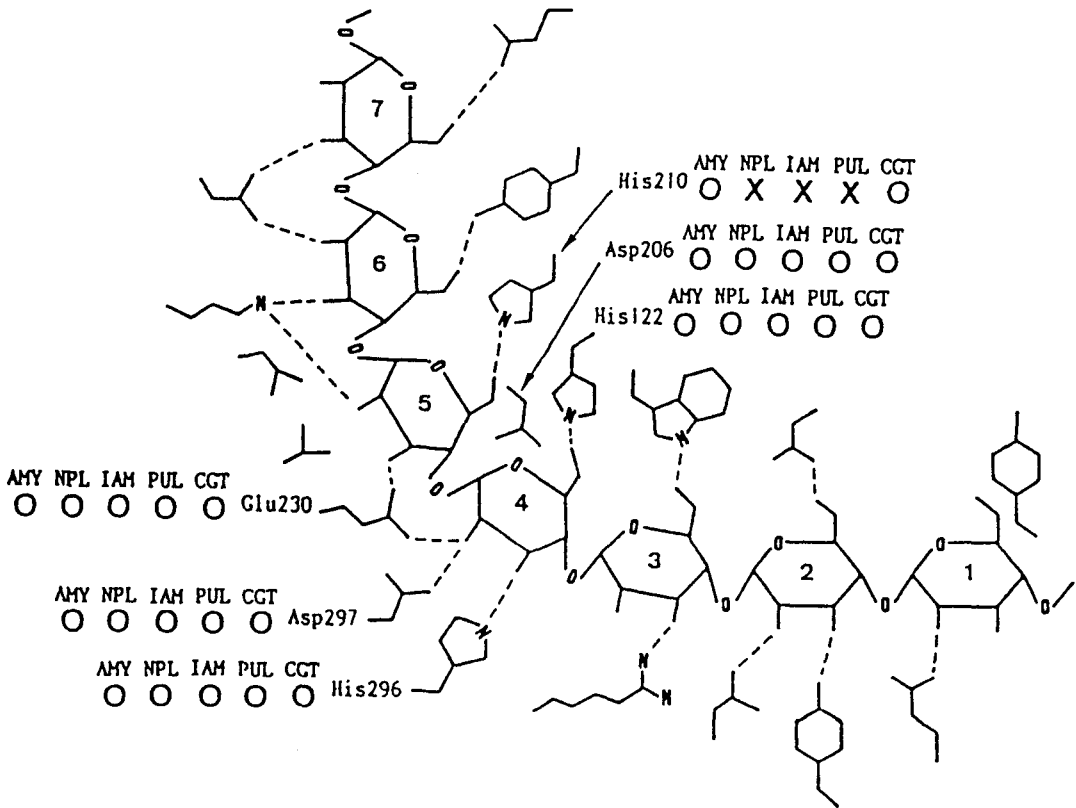
이들 酵素들 중에서 α -아밀라제와 CGTase는 α -1, 4-글루칸의 加水分解酵素이고 이소아밀라제와 플루라나제는 α -1, 6-글루칸의 加水分解酵素이다. 또한, 각각의 基質特異性, 反應樣式도 다르다. 네오

플루라나제는 α -1, 4-結合 뿐만 아니라 α -1, 6-글루코사이드結合도 분해해 基質인 澱粉을 높은 效率로 분해하지만 澱粉을 基質로 사용한 경우 分解率이 그다지 높지 않다. 酵素의 N末端으로부터 Region 1개의 거리를 비교해 보면, α -아밀라제와 CGTase가 전부 135 아미노酸殘基 이하인데 비해 플루라나제는 600 아미노酸殘基, 이소아밀라제는 291 아미노酸殘基이며 네오플루라나제는 이들의 중간치(242 아미노酸殘基)를 나타내고 있다[圖 3]. 따라서 네오플루라나제는 反應樣式과 一次構造의 관점에서 볼 때 α -아밀라제와 플루라나제의 중간에 위치하는 특이한 酵素라고 말할 수 있다.

		Region 1	Region 2	Region 3	Region 4
AMY	Consensus	DAVINH	GFRLDAAKH	EVID	FVDNHD
AMY	<i>A. ory.</i>	117DAVINH	202GLRITV	230EVLID	292FVENH
NPL	<i>B. stearo</i>	242DAVFNH	324GWRLDVANE	357E IWH	419LLGSHD
IAM	<i>P. amylo</i>	291DVVYNH	370GFRFDLASV	454EWSV	502FIDVHD
PUL	<i>K. aero.</i>	600DVVYNH	671GFRFDLMGY	704EGWD	827YVSKHD
PUL	<i>B. stearo.</i>	281DVVYNH	348GFRFDLMGI	381EGWD	464YVESHD
CGT	<i>K. pne.</i>	130DYADNH	219AIRIDA I KE	257EWFG	328FMDNHD
CGT	<i>B. mace.</i>	135DFAPNH	225GIRFDAVKH	258EWFL	324FIDNHD
CGT	Alk. B.	135DFAPNH	225GIRVDAVKH	257EWFG	323FIDNHD
CGT	<i>B. stearo.</i>	131DFAPNH	221GIRMDAVKH	253EWFL	319FIDNHD
BE	<i>E. coli.</i>	335DWVPGH	401ALRVDAVAS	426EFGG	521LPLSHD
BE	<i>Syne. sp.</i>	370DWVPGH	436GIRVDAVAS	461EYGG	556LALSHD
BE	Maize	277DVVHSH	347GFRFDG VTS	373EYFS	470YAESHD
MAL	<i>S. carls.</i>	106DLVINH	210GFRIDTAGL	276EVAH	344YIENHD
1, 6G	<i>B. cereus</i>	98DLVVNH	195GFRMDVIN F	255EMPG	324YWNNHD

[圖 3] 아밀라제의 保存領域

AMY : 아밀라제 CGT : CGTase NPL : 네오플루라나제 BE : 브랜칭효소 IAM : 이소아밀라제
MAL : 말타아제(α -글루코시다제) PUL : 플루라나제 1, 6G : 올리고-1, 6글루코시다제



[圖 4] 타카아밀라제의 活性中心部位

○ : 보존되어 있는 아미노산 × : 보존되어 있지 않는 아미노산

[圖 3]에 나타나 있는 相同性을 이용해 타카아밀라제 A의 活性中心 부근의 立體構造를 이들 酵素에 적용시켜 보았다[圖 4]. 타카아밀라제 A에서는 Asp 206, Glu 230과 Asp 297은 觸媒部位로서, His 122, His 210, His 296은 基質結合部位로서 추측되고 있다. 이들에 대응하는 아미노酸殘基는 다른 α -아밀라제, 네오플루라나제, 이소아밀라제, 플루라나제 및 CGTase에서도 놀랄 정도로 잘 보존되어 있었다[圖 3, 4]. 한편, 타카아밀라제의 His 210에 대응하는 아미노酸殘基만이 네오플루라나제, 이소아밀라제, 플루라나제에서 각각 Glu, Val, Try로 置換되어 있었다. 조사한 酵素들 중에

서 이들 3가지 酵素들만이 α -1, 6-글루코사이드結合을 분해할 수 있다는 것은 매우 흥미로운 점이다.

最近, 네오플루라나제와는 별도로 *Bacillus stearothermophilus*유래의 耐熱性 플루라나제 遺傳子(*pulT*)의 鹽基序列이 결정되었는데, [圖 3]에 나타나 있는 것처럼 4개의 保存領域은 이 耐熱性 플루라나제에도 존재하고 있었다. 또한, 타카아밀라제 A의 His 210에 대응하는 아미노酸殘基는 이 酵素에서 Ile으로 置換되어 있었다.

이처럼 相同性이 높은 아미노酸序列에는 酵素活性的 發現에 필요한 부위가 많이 포함되어 있고 이

들 이외의 아미노酸殘基에도 酵素特性에 관여하고 있는 경우가 있어 그 성격규명이 앞으로 해결해야 할 과제이다.

IV. α -아밀라제 페밀리의 提案

1. 네오폴루라나제의 改變

네오폴루라나제 遺傳子(*nplT*)를 클로닝해 鹽基序列을 결정한 결과, *nplT*는 1764鹽基로 되어 있으며 588아미노酸殘基(分子量 69144)를 코드하고 있다는 것을 알게 되었다. 네오폴루라나제의 아미노酸序列에는 α -아밀라제가 가지고 있는 相同性이 높은 4개의 保存領域이 존재하고 있으며 타카밀라제 A의 活性中心 부근의 立體構造와도 유사한 것으로 추측되고 있다.

이상의 결과를 근거로 해서 네오폴루라나제의 活性中心 부근에 존재하는 것으로 추측되는 아미노酸殘基를 部位特異的 突然變異法에 의해 치환시켜 野生型和 특성이 다른 여러가지의 變異型 네오폴루라나제를 만들었다. 타카아밀라제 A의 Glu 230, Asp 297 및 Asp 206에 각각 대응하는 Glu 357, Asp 424 및 Asp 328의 置換에 의해 네오폴루라나제의 활성이 완전히 소멸됨에 따라, 이 酵素에 있어서 이들 아미노酸殘基가 觸媒部位로서 작용하고 있다는 것은 틀림없는 사실이라고 추측된다. 또한, α -1, 4-글루코사이드結合의 分解活性이 동시에 소멸되므로 이들 反應은 동일한 部位에서 觸媒되고 있다는 것이 명확하게 밝혀지게 되었다.

그리고 이들 活性中心의 주변에 존재하는 것으로 추정되는 아미노酸殘基의 置換에 의해 풀루란의 加水分解 生成物인 파노스, 말토스, 글루코스의 비율이 확실하게 변화한 變異酵素도 얻을 수가 있었다. 이 變異酵素들의 α -1, 4- 및 α -1, 6-글루코사이드結合에 대한 分解比率도 변화하였고 파노스 등의 生成比率의 변화도 예측한 것과 일치하고 있다. 네

오폴루라나제는 이들 加水分解活性뿐만 아니라 α -1, 4 및 α -1, 6-轉移反應을 촉매한다는 것이 최근에 규명되었다. 이와같이 α -아밀라제 酵素群에 속하는 酵素로서 α -1, 6-轉移反應을 촉매하는 것은 이 酵素가 최초이다.

2. 部位特異的 아미노酸置換에 의한 CGTase로부터 α -아밀라제로의 變換

好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* No. 2 유래의 CGTase 遺傳子 클로닝을 시도한 결과 3종류의 遺傳子が 클로닝되었다. 이들의 鹽基序列은 서로 달랐지만 아미노酸序列이 동일하였기 때문에 아미노酸置換의 도입에는 *cgt1* 遺傳子를 사용하였다. CGTase는 4개의 도메인으로 되어 있는데, N 末端의 A 도메인에 존재하는 255번째의 Phe을 Ile으로 置換시키는 것만으로도 CGTase 活性이 소멸되어 버리고 아밀라제의 活性은 2.27배 증가하였다. 이 아미노酸은 活性中心이 아니라 基質과의 相互作用에 영향을 미치고 있는 것으로 추측되고 있기 때문에 동일한 活性中心을 이용해서 다른 酵素로 변환된 것으로 생각된다.

3. 耐熱性 알칼리성 아밀라제/폴루라나제 遺傳子の 클로닝

高溫 및 알칼리성의 조건에서 생육하고 아밀라제를 分泌하는 菌株를 토양으로부터 분리해 *Bacillus* sp. XAL 601라고 명명했다. 이 酵素의 유전자를 클로닝해 鹽基序列을 결정한 결과, 이 遺傳子는 6096鹽基(2032 아미노酸殘基)로 이루어져 있고 α -아밀라제 특유의 4개의 保存領域을 가지고 있다는 것을 알게 되었다. 또한 이 酵素는 하나의 活性中心에서 아밀라제와 풀루라나제의 활성을 동시에 나타내므로 아밀라제/폴루라나제 遺傳子(*aapT*)라고 명명했다.

4. 브랜칭酵素 遺傳子の 클로닝과 解析

*Bacillus stearothermophilus*와 *Bacillus cereus* 유래의 브랜칭 酵素 遺傳子를 클로닝해 그 鹽基序列을 결정한 결과, 이들 酵素는 652 및 646 아미노酸殘基로 구성되어 있고 α -아밀라제에서 볼 수 있는 4개의 保存領域이 발견되었다. 이 保存領域에 포함되어 있으며 活性發現에 필요하다고 추측되는 아미노酸殘基를 치환시키면 활성이 소멸되므로 브랜칭酵素에 있어서도 이 4개의 保存領域이 중요한 의미를 가진다는 것이 재확인되었다.

V. 結 論

이상의 결과를 종합해 보면 이들 酵素群은 構造的으로도 機能的으로도 상호 연관이 있고 이들을 하나의 α -아밀라제 페밀리로서 이해하는 것이 합리적이라고 생각된다. α -아밀라제 페밀리의 기준으로서 다음과 같은 4가지 조건을 들 수가 있다.

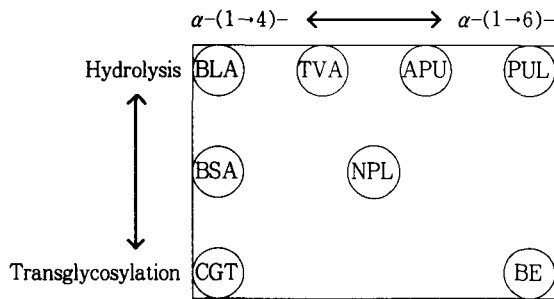
- ① α -글루코사이드結合에 작용한다.
- ② α -글루코사이드結合을 加水分解하여 α -아노머의 글루코스 또는 올리고糖을 생성시키거나 糖轉移에 의해 α -글루코사이드結合을 형성한다.

③ 一次構造上에 4개의 아밀라제 保存領域을 보유하고 있다.

④ 觸媒殘基로서 타카아밀라제 A의 Asp 206, Glu 230, Asp 297에 상당하는 Asp, Glu, Asp 殘基를 가지고 있다.

이상과 같은 相關關係를 정리한 결과는 [圖 5]와 같다. 橫軸은 作用部位 즉, α -1, 4-結合 및 α -1, 6-結合을 나타내며 縱軸은 作用機構 즉, 가수분해 및 당전위를 나타내고 있다. 澱粉을 기질로 하는 加水分解酵素 및 糖轉移酵素의 촉매기구는 기본적으로 동일하며 이들 酵素群은 상호변환이 가능하다고 볼 수 있다. 基質이 반응하는 곳(酵素活性의 中心)에 물분자가 있으면 가수분해시키고, 疎水性 環境下에서 물분자가 존재하지 않을 경우에는 糖轉移가 일어난다고 생각되어진다. 基質結合部位 및 그 부근의 아미노酸을 치환하면은 基質特異性이 다른 酵素가 생길 수 있다고 생각해도 좋을 것이다.

아밀라제에 관한 研究의 깊이나 폭넓음에 대해서는 이미 주지의 사실로 받아들여지고 있는데 이와 같이 간단히 정리해 버리는 데 대해서 異論이 충분히 있을 수 있다고 여겨진다. 그러나 연구과정에서는 항상 여러가지 의견이 제시될 수 있으며 이러한 논의를 거치는 과정에서 새로운 전개가 열릴 수 있는 가능성을 기대해 본다.



[圖 5] α -아밀라제 페밀리

BLA : 세균액화형 α -아밀라제 BSA : 세균당화형 α -아밀라제
 TVA : *T. vulgaris* 유래의 α -아밀라제 APU : α -아밀라제-폴루라나제
 BE : 브랜칭효소 * 다른 약어는 [圖 3]과 동일함.

(참고문헌)

1. S. Okada, S. Kitahata, M. Higashihara and J. Fukumoto : *Agr. Biol. Chem.*, 33, 900(1969)
2. Y. Takasaki : *Agr. Biol. Chem.*, 49, 1091 (1985)
3. J. F. Robyt and R. J. Ackerman : *Arch. Biochem. Biophys.*, 145, 105(1971)
4. N. Yoshigi, T. Chikano and M. Kamimra : *Agr. Biol. Chem.*, 49, 3369(1985)
5. J. F. Kennedy and C. A. White : *Starch/Starke*, 31, 93(1979)
6. K. Kainuma, S. Kobayashi and T. Harada : *Carbohydrate Res.*, 61, 345(1978)
7. T. Kuriki, S. Okada and T. Imanaka : *J. Bacteriol.*, 170, 1554(1988)
8. M. Shimizu, M. Kanno, M. Tamura and M. Suekane : *Agr. Biol. Chem.*, 42, 1681(1978)
9. Y. Sakano, S. Hiraiwa, J. Fukushima and T. Kobayashi : *Agr. Biol. Chem.*, 46, 1121(1982)
10. 岡田茂孝 : *醸酵工學誌*, 57, 396(1979)
11. 「澱粉, 關聯糖質酵素實驗法(中樹道徳, 具沼圭二編)」學會出版センター(1989)
12. "Handbook of amylases and related enzymes : their sources isolation methods, propertis and application"(Ed.) The Amylases Research Society of Japan, Pergamon Press(1988)
13. Y. Matsuura, M. Kusunoki, W. Date, S. Harada, S. Bando, N. Tanaka, and M. Kakudo : *J. Biochem.*, 86, 1773(1979)
14. Y. Matsuura, M. Kusunoki, W. Harada and M. Kakudo : *J. Biochem.*, 95, 697(1984)
15. T. Imanaka, "Recombinant mocrobes for industrial and agricultural application"(Eds.) Y. Murooka and T. Imanaka, p 449-464, Dekker, Inc. (1993)
16. 久保田倫夫, 松浦良樹, 堺修造, 勝部辛輝 : *澱粉科學*, 38, 141(1991)
17. C. Klein and G. E. Schulz : *J. Mol. Biol.*, 217, 737(1991)
18. R. Najajima T. Imanaka and S. Aiba : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 23 355(1986)
19. 角戸正夫 : *蛋白質核酵素*, 27, 1533(1982)
20. T. Kuriki, J. H. Park and T. Imanaka : *J. Ferment. Bioeng.*, 69, 204(1990)
21. T. Kuriki and T. Imanaka : *J. Gen. Microbiol.*, 135, 1521(1989)
22. T. Kuriki, H. Takata, S. Okada and T. Imanaka : *J. Bacteriol.*, 173, 6147(1991)
23. H. Takata, T. Kuriki, S. Okada, Y. Takesada, M. Iizuka, N. Minamiura and T. Imanaka : *J. Biol. Chem.*, 267, 18447(1992)
24. S. Fujiwara, H. Kakihara, B. W. Kim, A. Lejeune, M. Kanemoto, K. Sakaguchi and T. Imanaka : *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 4016 (1992)
25. S. Fujiwara, H. Kakihara, K. Sakaguchi and T. Imanaka : *J. Bacteriol.*, 174, 7478(1992)
26. S. P. Lee, M. Takagi, M. Morikawa and T. Imanaka : *Appl. Environ. Microbiol.* in press
27. H. Takata, T. Takaha, T. Kuriki, S. okada, M. Takagi and T. Imanaka, submitted