Properties and Application of Enzymes for Bacterial Glycogen Biosynthesis and Degradation

(Received September 19, 2003)

Hiroki Takata*

Biochemical Research Laboratory, Ezaki Glico Co., Ltd.
 (4-6-5, Utajima, Nishiyodogawa-ku, Osaka 555-8502, Japan)

Abstract: Structures and properties of enzymes for bacterial glycogen metabolism have been investigated. Branching enzyme (BE, EC 2.4.1.18), which is responsible for α -1,6 glucosidic linkages of glycogen, was found to catalyze cyclization of amylose. It was suggested that the ratio of branching to cyclization reactions is dependent on the size and concentration of substrate. We also demonstrated that the thermostable BE from *Bacillus stearothermophilus* efficiently catalyzes cyclization of B chains of amylopectin to produce highly-branched cyclic dextrin, Cluster Dextrin™. In spite of its high molecular weight and relatively long unit chains, Cluster Dextrin™ is highly soluble in water and shows characteristic properties for food and non-food applications. Moreover, glycogen-like polysaccharide with an extremely high molecular weight ($>10,000,000$) could be synthesized by using α -glucan phosphorylase with BE. Properties of other enzymes for glycogen metabolism are also described. Comparison of the primary structures of ADP-glucose pyrophosphorylases (AGPs) derived from genome projects and the experimental results using the enzyme from *B. stearothermophilus* suggest a remarkable variety of AGP.

Key words: branching enzyme, cyclization, dextrin, glycogen, ADP-glucose pyrophosphorylase

細菌グリコーゲン合成・分解系酵素の性質と、そのデンプン加工への利用に関する研究**

高田洋樹*

江崎グリコ株式会社生物化学研究所 (555-8502 大阪市西淀川区歌島 4-6-5)

グリコーゲンは、動物、糸状菌類、酵母、細菌および始原菌に広く分布する貯蔵多糖であり、 α -1,4-グルコシド結合と α -1,6-グルコシド結合により構成されるグルカンである。細菌グリコーゲンは、植物のデンプンと基本的に同じ酵素セットによって Fig. 1 に示す経路により合成される。一方、グリコーゲンの分解経路については、その詳細は未解明であるが、加水分解酵素である α -アミラーゼ、枝きり酵素、 α -グルコシダーゼなどと、加リン酸分解酵素である α -グルカンホスホリラーゼなどが関与すると考えられる。

私たちは、新たなデンプン加工用酵素の開発という見地から、これらの酵素について興味をもち、特に *Bacillus* 属細菌のグリコーゲン合成・分解系酵素に関する研究を行った。

本稿では主としてブランチングエンザイムの反応と利用について述べる。また、他の酵素について得られたいくつかの新しい知見についても簡単に触れる。

1. ブランチングエンザイムとは

ブランチングエンザイム (系統名: 1,4- α -D-glucan: 1,4- α -D-glucan 6- α -D-(1,4- α -D-glucano)-transferase, EC 2.4.1.18. 以下 BE と略す) は、 α -1,4-グルコシド結合を切断し、別のグルコース残基の 6 位 OH 基に転移することにより、 α -1,6-結合を合成する。BE は動物、植物、糸状菌類、酵母、および細菌に広く分布しており、グリコーゲンあるいはデンプンの分岐結合合成を触媒している。

1970 年代に Borovsky ら¹⁻⁴⁾が、馬鈴薯 BE の反応について詳細に調べ、BE が分子間枝作り反応 (Fig. 2 A) を触媒することを証明した。一方、分子内枝作り反応 (Fig. 2 B) が触媒されるかどうかは、不明と述べられている。BE は Glycoside Hydrolase Family 13 (α -アミラーゼファミリー) の一員とされ、 α -アミラーゼと基本的に同一のメカニズムにより、単一の活性中心において α -1,4-結合切断と 6 位 OH 基への転移を触媒すると考えられている⁵⁻⁷⁾。

BE は、応用面からは、デンプン構造改変用酵素として注目されていた⁸⁾が、実用には至っていなかった。

2. BE のアミロースへの作用

私たちは、耐熱性 BE 生産菌を自然界から検索し、*Ba-*

* Tel. +81-6-6477-8425, Fax. +81-6-6477-8362, E-mail: takata-hiroki@glico.co.jp.

**平成 15 年度日本応用糖質科学会奨励賞受賞講演

Fig. 1. Pathway for bacterial glycogen biosynthesis and degradation.

○, glucosyl residue; ∅, glucose; ↓, α-1,6 glucosidic linkage; —, α-1,4 glucosidic linkage; ○P, α-D-glucosyl 1-phosphate; ○ADP, ADP-glucose; AGP, ADP-glucose pyrophosphorylase; GS, glycogen synthase; BE, branching enzyme; GP, α-glucan phosphorylase, PP_i, pyrophosphate.

cillus stearothermophilus TRBE 14 株を選択した。本菌株より BE 構造遺伝子を単離し、大腸菌を宿主とした遺伝子発現系を構築し、酵素の諸性質を調べた⁹⁾。

得られた耐熱性 BE のアミロースへの作用を調べているとき、反応とともに基質分子量が低下していくことを見出した⁹⁾。このとき還元力上昇は非常にわずかであり、加水分解反応による低分子化ではないと考えた。分子間枝作り反応、または分子内枝作り反応では、分子の数が反応前後で変わらないため、平均分子量も反応前後で変化しない (Fig. 2 A, B)。一方、環状化反応 (Fig. 2 C) を想定すれば、還元力上昇を伴わない低分子化を説明できる。環状構造部分は、生産物をグルコアミラーゼ処理することによって単離することができた⁹⁾。得られたグルコアミラーゼ耐性グルカンは、α-アミラーゼを作用させることによって容易に分解された。また、イソアミラーゼとグルコアミラーゼを同時に作用させることによっても分解された。さらに、質量分析を行ったところ、グルコアミラーゼ耐性成分の分子量は、162 *n* (*n* は重合度) であり、還元末端をもたないことが確認された⁹⁾。

BE による環状化反応は、非常に特殊な反応という印象を受けるかもしれない。しかし、Fig. 2 B と C を見比べると、分子内枝作り反応と環状化反応は基本的に同じであることがわかる。つまり、α-1,4-結合を切断した後、切断位置から還元末端側の残基に転移すれば、分子内枝作り反応であり、逆に非還元末端側の残基に転移すれば、環状化反

Fig. 2. Model of action of BE on amylose.

Models of intermolecular branching (A), intramolecular branching (B), and cyclization (C) reactions are shown. Solid line, α-1,4-glucan chain; R, reducing end of α-1,4-glucan chain; arrow, α-1,6-glucosidic linkage; ▽, the α-1,4-glucosidic linkage to be cleaved by BE; ▲, the glucosyl residue to be used as an acceptor.

応となる。

BE の触媒反応進行過程は明確になっていないが、反応過程のいずれかの時点で、切断される α-1,4-結合 (Fig. 2 における▽) と受容体となる 6 位 OH 基 (▲) が接近するはずである。分子間枝作り反応ならば、2 本のアミロース鎖が並んだところを想定すればよい (Fig. 2 A) が、分子内枝作りあるいは環状化反応はどのように触媒されると考えられるだろうか。

水溶液中において、アミロースは分子全体としてはランダムコイルとして挙動すると考えられている¹⁰⁾。したがって、Fig. 2 には、剛直な構造のように図示したが、実際には単一アミロース分子の 2 点間が近接した位置をとる場合も当然あると考える。さらに、希薄溶液中では、アミロース分子の分子間平均距離は、分子自体のサイズに比べてずっと大きいとされている^{11,12)}。したがって、希薄溶液中においては、むしろ分子間枝作り反応よりも、分子内枝作り反応、もしくは環状化反応が触媒される確率が高いかもしれない。

環状化反応と枝作り反応の比率は、基質アミロースの濃度、および重合度 (DP) に依存するとともに、BE の種類にも依存すると考えている。BE の反応産物からは、DP 17 以下の低分子環状糖は検出されなかった⁹⁾。したがって、短いグルカン鎖を優先して転移する種類の BE では、環状化反応の触媒される確率は低くなるかもしれない。しかし、すべての BE は多かれ少なかれ環状化反応を触媒す

るだろうと、私は考えている。

これまでに調べたところでは、中温菌である *Bacillus cereus* 由来 BE¹³⁾、および超好熱性細菌 *Aquifex aeolicus* 由来 BE¹⁴⁾ が環状化反応を触媒することを確認した。また、北村は、馬鈴薯由来 BE をアミロースに作用させると、還元力上昇を伴わない低分子化が起こることを報告している^{15,16)}。これは、馬鈴薯 BE も環状化反応を触媒することを強く示唆するものと考えられる。

次に、BE によるアミロースからの最終産物の構造を調べた。上述のように、Fig. 2 A, B, C の 3 種の反応すべてが程度の差はあれ、起こるはずである。さらに、どの反応の生産物もある程度以上の直鎖部分があれば、再び BE の作用を受けることができるはずである。そして平均鎖長がある一定限度以下になるまで反応が続くと予想される。

まず、分子量分布の狭い ($M_w/M_n < 1.1$) 完全直鎖のアミロースを 6 種類 (M_w 5000 から 320,000) 準備し、BE を十分に (α -1,6-結合増加が停止するまで) 作用させて反応産物の構造を調べた¹³⁾。意外なことに、どの基質を用いた場合も主生産物の重量平均分子量はほぼ同じであった (約 60,000)。長いアミロースからはより小さな分子が主として生じ、短いアミロースからはより大きな分子が主として生じたことになる。高分子基質の場合は、環状化反応が優勢となり、低分子基質の場合は、分子間枝作り反応が優勢となったためであろうと考えている。

3. BE のアミロペクチンへの作用

B. stearothermophilus の BE のアミロペクチンへの作用を調べたところ、やはり還元力の上昇を伴わない低分子化が起こった。ゲル濾過分析によると BE によるアミロペクチン分解反応はある一定限度で停止していた (Fig. 3)^{17,18)}。

Table 1 に、典型的な最終産物の構造パラメータを示す。

最終産物の単位鎖長分布を高性能陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて調べたところ、基質アミロペクチンと非常によく似ていることがわかった (Fig. 4 A, B)。詳細に比較すると (Fig. 4 C)、DP 6, 7, 11 および 12 の単位鎖と DP 22-35 の単位鎖が増加し、DP 37 以上の長い単位鎖が減少していた。さらに DP 48 以上の単位鎖は検出できなくなった。

次に、本生産物からの環状成分の単離を試みた。生産物をグルコアミラーゼで完全に処理し、2.6% の収率でエタ

ノールで沈澱するグルカン (グルコアミラーゼ耐性グルカン) を得た。その構造を詳細に解析したところ、Table 2 に示すパラメータを得た。平均の分岐間鎖長 (Span length) は 4.8 であり、Hizukuri と Abe¹⁹⁾ が示したアミロペクチンの高度分岐部分の構造と大きな矛盾のないものであった。

以上の結果から、BE はアミロペクチンのクラスター構

Fig. 3. Time course of action of BE on amylopectin.

Amylopectin (0.4% w/v) was treated with 400 U/g substrate of *B. stearothermophilus* BE. At intervals, the sample was removed and analyzed by gel-filtration chromatography.

Fig. 4. Chain-length distribution of amylopectin and BE product.

The unit chains of amylopectin (A) and BE product (B) were separated by high-performance anion exchange chromatography. Panel C shows differential histogram between amylopectin and BE product.

Table 1. Structural parameters of amylopectin and BE product.

Parameter	Amylopectin	BE product
Weight-average DP	N.D.*	900
Reducing sugar (%)	N.D.	0.017
α -1,6 Linkage (%)	5.2	6.3
Number-average chain length	19	16
β -Amylolysis limit (%)	56	59
Exterior chain length	13	11
Interior chain length	5	4

*Not determined.

造²⁰⁾の継ぎ目を形成する B 2 鎖以上の単位鎖に主として作用し、これを環状化し、高度に分岐した環状糖を合成したと結論した (Fig. 5)。

アミロースの環状化と異なり、BE によるアミロペクチンの環状化は、一般的とはいえないかもしれないと考えている。たとえば、Kawabata ら²¹⁾は、*Neurospora crassa* の BE の作用を調べ、アミロペクチンの環状化はほとんど、あるいは全く触媒されなかったことを示している。私たちの実験でも、馬鈴薯由来 BE や *Bacillus cereus* 由来 BE のアミロペクチン環状化効率、*B. stearothermophilus* BE と比較して低いことが示唆されている (未発表)。一方で、*Aquifex aeolicus* 由来の超耐熱性 BE は、非常に効率よくアミロペクチン環状化反応を触媒した¹⁴⁾。

4. クラスター デキストリン™ の製造と利用

B. stearothermophilus BE によるアミロペクチンの環状化は、高濃度基質を用いた場合も効率よく進行し、工業利用に向いていることがわかった²²⁾。この反応で得られた高度

Table 2. Structural parameters of the glucoamylase-resistant glucan.

Parameter*	
Weight-average DP	49
Number of glucosyl stubs	5.5
DP of ring structure	43.5
Number of α -1,6 linkages in the ring structure	3.5
Number of α -1,4 linkages in the ring structure	40
Number-average chain length	12.4
Span length**	4.8

*Assuming the number-average DP was similar to weight-average DP. **Average span length between α -1,6 linkages.

Amylopectin

Fig. 5. Model of action of BE on amylopectin.

Solid line, α -1,4-glucan chain; arrow, α -1,6-glucosidic linkage; ∇ , the α -1,4-glucosidic linkage to be cleaved by BE; $\blacktriangle$, the glucosyl residue to be used as an acceptor.

分岐環状糖質をクラスター デキストリン™ と名づけ、2002 年より販売を開始した。BE の生産性改良、クラスター デキストリンの工業的製造方法開発は、それぞれナガセケムテックス(株)、日本食品化工(株)との共同研究である。

クラスター デキストリンは、従来のデキストリンと比較して、分子量分布が狭い (Fig. 6)、比較的長い単位鎖を多く含む、環状部分がある (還元末端が少ない)、という構造上の特徴がある。これらの構造特性より、クラスター デキストリンは、通常のデキストリンと比較して

- ①水に溶けやすい
- ②得られた溶液は老化しにくく安定
- ③溶液の浸透圧が低い
- ④異味異臭が少ない
- ⑤着色しにくい
- ⑥乾燥しやすく吸湿しにくい

という、すぐれた特徴を有していた。また、酸味や苦味、アルコール感をマイルドにする効果、臭みを緩和する効果をもっている²³⁾。これは、比較的長い単位鎖に、低分子物質を包接することができるためと考えている。これに加えて、④の異味異臭が少ないということから、食品本来の風味を損なうことなく、味質を改善することが可能である。

①～⑤の特徴から、クラスター デキストリンは飲料への使用にも適している²⁴⁾。浸透圧が低いため、飲料に用いたときビタミンやミネラルを添加しても、適切な浸透圧に調整しやすい。これは、胃から腸にすばやく移行する飲料を設計する上で重要である。さらに、持久力を増強する効果を有することもわかっている²⁵⁾。

一般に、デキストリンは粉末化基剤としても汎用されているが、クラスター デキストリンを油脂や香料などの粉末化基剤として用いると、従来よりも安定性の高い粉末が得られることもわかった²⁶⁾。

現在、クラスター デキストリンは、江崎グリコ(株)のス

Fig. 6. Molecular weight distribution of Cluster Dextrin™ and other commercial dextrans.

Each dextrin was subjected to high-performance gel filtration chromatography with a multi-angle laser-light scattering (LS) detector and a refractive index (RI) detector. The molecular weight distribution was calculated from LS and RI signals by using software ASTRA (Wyatt Technology Co.). A, dextrin with dextrose equivalent (DE) 16; B, dextrin with DE 9; C, Cluster dextrin™; D, dextrin with DE 3.

スポーツドリンクの主成分として採用されているほか、味質改善効果、あるいは粉末化基剤としての効果を利用して、いくつかの製品に採用されている。

5. グリコーゲンの合成

これまでに述べてきたように、BE を単にアミロースやアミロペクチンに作用させた場合には、分子量数万～数十万程度のグルカンしか得られなかった。これらも高分子であるが、天然のグリコーゲンは、分子量 10^7 におよぶといわれている。そこで、天然のグリコーゲンに近い超高分子糖質を合成したいと考えた。

グルコース-1-リン酸とプライマーを基質として α -グルカンホスホリラーゼ (GP) を作用させるとアミロースを合成できることはよく知られている¹⁶⁾。また、BE と GP を組み合わせてグリコーゲンを合成しようとした例も多数報告されている (たとえば文献 27)。しかし、生産物の分子量を詳しく調べた例はあまりない。

そこで、BE と GP を同時に作用させ、 α -グルカンを合成した (Table 3)。その分子量を光散乱法により調べたところ、重量平均分子量は 1000 万以上であり、天然のグリコーゲンに匹敵するものであった。また、平均鎖長は GP と BE の比を変えることにより制御可能だった²⁸⁾。

6. その他のグリコーゲン合成・分解系酵素について

細菌のグリコーゲン合成・分解系酵素としては、大腸菌由来のものが最もよく研究されている。一方で、大腸菌以外の種由来のものについてはあまり研究されていなかった。

私たちは、*B. stearothermophilus* TRBE 14 株の BE 遺伝子 (*glgB*) の下流を調べたところ、さらにグリコーゲン関連遺伝子が並んでいることを見出した。

そのグリコーゲン関連遺伝子群を単離し、全塩基配列を決定したところ、約 9400 bp の DNA 断片内に五つの遺伝子が存在しており、*glgBCDAP* とした²⁹⁾。Fig. 7 に大腸菌および *B. stearothermophilus* の *glg* 遺伝子群の構成を示す。*B. stearothermophilus* の遺伝子のうち、*glgC*, *A*, *P* は、その相同性から、それぞれ ADP-グルコースピロホスホリラーゼ (AGP)、グリコーゲン合成酵素 (GS)、GP をコードすることが推定できた。

Table 3. Glycogen-like polysaccharide synthesized by cooperative action of branching enzyme and α -glucan phosphorylase.

BE/GP*	M _w (10 ⁶)**	Number-average chain length
62.5	14.0	38.9
125	20.6	24.4
250	19.6	15.7
500	16.9	13.7

*The ratio of activity of branching enzyme to that of α -glucan phosphorylase. **Weight-average molecular weight.

一方、*glgD* のコードするタンパク質 (GlgD) は、AGP と低い相同性を有していた。実験の結果、GlgC タンパク質のみでも AGP 活性があるが、GlgC タンパク質 2 個と、GlgD タンパク質 2 個からなるヘテロ 4 量体型 AGP が構成されることにより高い AGP 活性が発現されることがわかった。それまで一般に植物 AGP はヘテロ 4 量体型で、細菌 AGP はホモ 4 量体型であるとされていたが、本研究の例はそのはじめての例外となった^{30,31)}。

その他、GS、GP についても大腸菌と *B. stearothermophilus* の間には、種々の差があることがわかった。詳細については原報をご覧ください^{22,32)}。

ヘテロ 4 量体型の細菌 AGP は、1997 年の私たちの発表後、報告がない。一方、その間に多くのゲノム塩基配列が報告されている。そこで、あらためて、GlgD 類似タンパク質が他の生物に存在するか否かを検索した。その結果、*Bacillus* 属細菌以外に、*Streptococcus* 属、*Lactococcus* 属、*Clostridium* 属、*Lactobacillus* 属、*Deinococcus* 属、*Thermotoga* 属等の細菌が、GlgD 様タンパク質をもっていることがわかった。*Bacillus* 属同様、これらの細菌は GlgC 様タンパク質も同時にもっている。

これらを含む 64 種の AGP タンパク質のアミノ酸配列から分子系統樹を作成した (Fig. 8)。この図より AGP タンパク質は、五つのタイプに分けられることが示唆された。仮にタイプ I-V と名づけると、*Bacillus* 属や *Streptococcus* 属はタイプ II と III、大腸菌はタイプ V のみ、*Vibrio cholerae* はタイプ IV と V をもっていた。同じ *Bacillus* 属でも、*Bacillus cereus* は、タイプ III のみをもっていた。

以上のことから、ヘテロ 4 量体型 AGP は、グラム陽性細菌を中心に幅広く存在すること、さらに別のタイプの細菌 AGP も存在する可能性があることが示唆された (未発表)。

細菌は非常に多様な環境に生息している。そして、グリコーゲンの機能および合成タイミングも多様であることが示唆されている。このことから、グリコーゲン合成調節機構、AGP のタイプとともに当然多くのバリエーションが存在しうると考える。

Fig. 7. Schematic representation of structures of gene clusters for glycogen biosynthesis in *Escherichia coli* and *Bacillus stearothermophilus*.

Open arrows indicate open reading frames (ORFs) on chromosomal DNA. Identities between amino acid sequences of proteins encoded by the ORFs are also shown. Encoded proteins are as follows; *glgB*, branching enzyme; *glgX*, debranching enzyme; *glgC*, subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase; *glgD*, subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase; *glgA*, glycogen synthase; *glgP*, α -glucan phosphorylase.

Fig. 8. Phylogenetic relationship among 64 AGP-related proteins.

The amino acid sequences used for the analysis are obtained from the web-site of Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG, <http://www.genome.ad.jp/kegg/>), and the phylogenetic tree was constructed by using Clustal W.

The sources of AGP-related proteins are as follows; 1-6, *Arabidopsis thaliana*; 7, *Escherichia coli* K-12; 8, *Salmonella typhi*; 9, *Yersinia pestis*; 10, *Shigella flexneri*; 11, *Haemophilus influenzae*; 12, *Pasteurella multocida*; 13-14, *Vibrio cholerae*; 15-16, *Vibrio vulnificus*; 17-18, *Vibrio parahaemolyticus*; 19, *Shewanella oneidensis*; 20, *Nitrosomonas europaea*; 21, *Mesorhizobium loti*; 22, *Sinorhizobium meliloti*; 23, *Agrobacterium tumefaciens*; 24, *Bradyrhizobium japonicum*; 25-26, *Bacillus subtilis*; 27-28, *Bacillus halodurans*; 29, *Bacillus cereus*; 30-31, *Oceanobacillus iheyensis*; 32-33, *Lactococcus lactis*; 34-35, *Streptococcus pneumoniae*; 36, *Streptococcus agalactiae* 2603; 37-38, *Streptococcus agalactiae* NEM 316; 39-40, *Streptococcus mutans*; 41-42, *Lactobacillus plantarum*; 43-44, *Clostridium acetobutylicum*; 45-46, *Clostridium perfringens*; 47, *Mycobacterium tuberculosis*; 48, *Mycobacterium leprae*; 49, *Corynebacterium glutamicum*; 50, *Corynebacterium efficiens*; 51, *Streptomyces coelicolor*; 52, *Bifidobacterium longum*; 53-54, *Fusobacterium nucleatum*; 55, *Chlamydia trachomatis*; 56, *Chlamydia muridarum*; 57, *Chlamydomophila pneumoniae*; 58, *Synechocystis* sp. PCC 6803; 59, *Thermosynechococcus elongates*; 60, *Anabaena* sp. PCC 7120; 61-62, *Deinococcus radiodurans*; 63-64, *Thermotoga maritima*.

7. おわりに

本研究では、グリコーゲン合成・分解系酵素を対象にしていくつかの新しい知見を得ることができた。しかし、微生物の多様性を考えると、また別の構造や、特異性をもつ酵素が存在することも十分あり得る。Fig. 1 にグリコーゲン合成系を示したが、この酵素系自体ですら全く別のパターンが存在するかもしれない。たとえば、藍藻において唯一の BE 遺伝子を破壊しても少量の α -1,6-結合が合成されたことが報告されている³³⁾。また、超好熱性細菌や始原菌の一部は、そのゲノム上に GS や枝切り酵素の遺伝子もっているにもかかわらず、BE 遺伝子をもたない。これらのことは、BE とはまったく別の α -1,6-結合合成機構の存在を示唆する。また、*Neisseria* 属においては、アミロスクラーゼが GS の代わりに α -1,4-結合合成に使われている可能性がある³⁴⁾。これからは、さらに柔軟に自然界からの教えを受け入れられる態度で研究に取り組みたい。

本研究遂行中、終始ご指導ご鞭撻をいただいた、京都大

学大学院工学研究科教授 今中忠行先生に厚くお礼申し上げます。

また、終始あたたかいご指導をいただきました北陸先端科学技術大学院大学教授 高木昌宏先生に感謝申し上げます。

クラスター デキストリンの構造分析については、鹿児島大学名誉教授 故 檜作 進先生にご指導とご助言をいただきました。深く感謝いたしますとともに先生のご冥福をお祈りいたします。また、大阪市立大学理学部名誉教授 南浦能至先生、同助教授 飯塚 勝先生、信州大学農学部教授 北畑寿美雄先生、大阪府立大学農学部教授 北村進一先生に、多くのご助言、ご指導をいただきました。ここにお礼申し上げます。

クラスター デキストリンの事業化において、ご協力いただきましたナガセケムテックス㈱の橘 佳久氏、田中悟広氏、鈴木裕治氏、内田和男氏、田中朋子氏をはじめとする関係者の方々、日本食品化工㈱研究所の中久喜輝夫博士、小川浩一博士、住吉秀幸氏、藤本佳則氏、同技術開発

部の海野剛裕博士，同営業第三部の中村信之博士，山本幹男博士をはじめとする関係者の方々に感謝します。

本研究は，主として江崎グリコ(株)生物化学研究所で行ったものです。終始ご指導ご鞭撻をいただいた，前取締役所長 岡田茂孝博士に深謝いたします。また，現所長の栗木隆博士にお礼申し上げます。

クラスター デキストリンの事業化および用途開発の多くは，上にあげました共同研究先のほか，江崎グリコ(株)新規事業本部新素材担当チーム，健康食品部，中央研究所，菓子開発研究所，冷菓開発研究所，食品開発研究所の方々によるものです。深く感謝いたします。最後になりましたが，鷹羽武史博士，小島岩夫氏，柳瀬美千代氏をはじめとする生物化学研究所の先輩，同僚諸氏に感謝いたします。

文 献

- 1) D. Borovsky, E.E. Smith and W.J. Whelan: Purification and properties of potato 1,4- α -D-glucan: 1,4- α -D-glucan 6- α -(1,4- α -glucano)-transferase: Evidence against a dual catalytic function in amylose-branching enzyme. *Eur. J. Biochem.*, **59**, 615-625 (1975).
- 2) D. Borovsky, E.E. Smith and W.J. Whelan: Temperature-dependence of the action of Q-enzyme and the nature of the substrate for Q-enzyme. *FEBS Lett.*, **54**, 201-205 (1975).
- 3) D. Borovsky, E.E. Smith and W.J. Whelan: On the mechanism of amylose branching by potato Q-enzyme. *Eur. J. Biochem.*, **62**, 307-312 (1976).
- 4) D. Borovsky, E.E. Smith, W.J. Whelan, D. French and S. Kikumoto: The mechanism of Q-enzyme action and its influence on the structure of amylopectin. *Arch. Biochem. Biophys.*, **198**, 627-631 (1979).
- 5) H. Takata, T. Kuriki, S. Okada, Y. Takesada, M. Iizuka, N. Minamiura and T. Imanaka: Action of neopullulanase: Neopullulanase catalyzes both hydrolysis and transglycosylation at α -(1 $\rightarrow$ 4)- and α -(1 $\rightarrow$ 6)-glucosidic linkages. *J. Biol. Chem.*, **267**, 18447-18452 (1992).
- 6) H. Takata, T. Takaha, T. Kuriki, S. Okada, M. Takagi and T. Imanaka: Properties and active center of the thermostable branching enzyme from *Bacillus stearothermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 3096-3104 (1994).
- 7) T. Kuriki, H.P. Guan, M. Sivak and J. Preiss: Analysis of the active center of branching enzyme II from maize endosperm. *J. Protein Chem.*, **15**, 305-313 (1996).
- 8) 岡田茂孝，吉川恵温，谷口倫夫，北畑寿美雄：Bacillus 属細菌の生産する枝作り酵素について。澱粉科学，**30**，223-230 (1983)。
- 9) H. Takata, T. Takaha, S. Okada, M. Takagi and T. Imanaka: Cyclization reaction catalyzed by branching enzyme. *J. Bacteriol.*, **178**, 1600-1606 (1996).
- 10) 北村進一：溶液中におけるアミロースのコンホメーションと物性に関する研究。澱粉科学，**36**，303-309 (1989)。
- 11) M.J. Miles, V.J. Morris and S.G. Ring: Gelation of amylose. *Carbohydr. Res.*, **135**, 257-269 (1985).
- 12) V.J. Morris: Starch gelation and retrogradation. *Trends Food Sci. Technol.*, **1**, 2-6 (1990).
- 13) 高田洋樹，鷹羽武史，岡田茂孝，高木昌宏，今中忠行：Bacillus cereus 由来 branching enzyme による環状化反応，農化（講演要旨）39，(1997)。
- 14) H. Takata, K. Ohdan, T. Takaha, T. Kuriki and S. Okada: Properties of branching enzyme from hyperthermophilic bacterium, *Aquifex aeolicus*, and its potential for production of highly-branched cyclic dextrin. *J. Appl. Glycosci.*, **50**, 15-20 (2003).
- 15) 北村進一：酵素合成アミロペクチンの構造と物性に関する研究・応用糖質科学（講演要旨），**42**，308 (1995)。
- 16) S. Kitamura: Starch polymers, natural and synthetic. in *Polymeric Materials Encyclopedia*, J.C. Salamone, ed., CRC Press, Boca Raton, pp. 7915-7922 (1996).
- 17) H. Takata, T. Takaha, S. Okada, S. Hizukuri, M. Takagi and T. Imanaka: Structure of the cyclic glucan produced from amylopectin by *Bacillus stearothermophilus* branching enzyme. *Carbohydr. Res.*, **295**, 91-101 (1996).
- 18) 高田洋樹，鷹羽武史，中村弘康，岡田茂孝，檜作 進，高木昌宏，今中忠行：プランチングエンザイムによる新規環状糖の合成。応用糖質科学，**43**，257-264 (1996)。
- 19) S. Hizukuri and J. Abe: A new method of enzymic analysis of amylopectin structure. in *Plant Polymeric Carbohydrates; International Symposium, Berlin, Germany, July 1-3, 1992*, F. Meuser, D.J. Manners and W. Seibel, eds., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 16-25 (1993).
- 20) S. Hizukuri: Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its significance. *Carbohydr. Res.*, **147**, 342-347 (1986).
- 21) Y. Kawabata, K. Toeda, T. Takahashi, N. Shibamoto and M. Kobayashi: Preparation of highly branched starch by glycogen branching enzyme from *Neurospora crassa* N 2-44 and its characterization. *J. Appl. Glycosci.*, **49**, 273-279 (2002).
- 22) H. Takata, T. Takaha, H. Nakamura, K. Fujii, S. Okada, M. Takagi and T. Imanaka: Production and some properties of a dextrin with a narrow size distribution by cyclization reaction of branching enzyme. *J. Ferment. Bioeng.*, **84**, 119-123 (1997).
- 23) 高田洋樹，芳川憲司，藤本佳則，住吉秀幸：クラスターデキストリン®の飲料・食品への応用。食品と科学，**45**，73-77 (2002)。
- 24) 滝井 寛：クラスター デキストリン®を利用したスポーツドリンクの開発。食品と開発，**38**，11-13 (2002)。
- 25) H. Takii, K. Ishihara, T. Kometani, S. Okada and T. Fushiki: Enhancement of swimming endurance in mice by highly branched cyclic dextrin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 2045-2052 (1999).
- 26) Y. Kagami, S. Sugimura, N. Fujishima, K. Matsuda, T. Kometani and Y. Matsumura: Oxidative stability, structure, and physical characteristics of microcapsules formed by spray drying of fish oil with protein and dextrin wall materials. *J. Food Sci.*, **68**, 2248-2255 (2003).
- 27) D.S. Tolmasey and C.R. Krisman: The degree of branching in (α 1,4)-(α 1,6)-linked glucopolysaccharides is dependent on intrinsic properties of the branching enzymes. *Eur. J. Biochem.*, **168**, 393-397 (1987).
- 28) K. Fujii, H. Takata, M. Yanase, Y. Terada, K. Ohdan, T. Takaha, S. Okada and T. Kuriki: Bioengineering and Application of Novel Glucose Polymers. *Biocatal. Biotransform.*, **21**, 167-172 (2003).
- 29) H. Takata, T. Takaha, S. Okada, M. Takagi and T. Imanaka: Characterization of a gene cluster for glycogen biosynthesis and a heterotetrameric ADP-glucose pyrophosphorylase from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bacteriol.*, **179**, 4689-4698 (1997).
- 30) 高田洋樹：ADP-グルコースピロホスホリラーゼ。「澱粉科学の事典」，不破英次，小巻利章，檜作 進，貝沼圭二編集，朝倉書店，東京，pp. 80-82 (2003)。
- 31) J. Preiss: ADPglucose pyrophosphorylase: basic science and applications in biotechnology. *Biotechnol. Annu. Rev.*, **2**, 259-279 (1996).
- 32) H. Takata, T. Takaha, S. Okada, M. Takagi and T. Imanaka: Purification and characterization of α -glucan phosphorylase from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Ferment. Bioeng.*, **85**, 156-161 (1998).
- 33) S.H. Yoo, M.H. Spalding and J. Jane: Characterization of cyanobacterial glycogen isolated from the wild type and from a mutant lacking of branching enzyme. *Carbohydr. Res.*, **337**, 2195-2203 (2002).
- 34) V. Buttcher, M. Quanz and L. Willmitzer: Molecular cloning, functional expression and purification of a glucan branching enzyme from *Neisseria denitrificans*(1). *Biochim. Biophys. Acta*, **1432**, 406-412 (1999).