Amylase の Transglycosylation 作用について

岡 田 巖 太 郎*

(昭和48年4月5日受理)

Transglycosylation Action of Amylases

Gentaro OKADA*

*Department of Biology, Faculty of Education,
Shizuoka University, Shizuoka, Japan

By using the substrates of defined anomeric form, with very brief incubation to limit mutarotation, evidence has been obtained that the condensations require donor substrates of specific configuration. That is, crystalline glucoamylase from *Rh. niveus* has been found to catalyze the rapid synthesis of maltose and a slower synthesis of isomaltose specifically from β -D-glucopyranose. Crystalline sweet potato β -amylase, likewise, has been found to catalyze the rapid synthesis of maltotetraose specifically from β -maltose, and crystalline hog pancreatic α -amylase the rapid synthesis of maltotetraose specifically from α -maltose.

A rapid approach to equilibrium was found both in maltose synthesis from β -D-glucopyranose by glucoamylase, and in maltotetraose synthesis from β -maltose by β -amylase. Moreover, essentially the same equilibrium ($K_{eq} = ca. 0.13$) was reached by these homologous hemiacetal-to-secondary carbinol condensations. The configurational inversion accompanying both condensations, finally, reveals their mechanism as one of glycosyl transfer.

Crystalline α -amylases from six different biological sources, as well as crude salivary amylase, were examined and found to catalyze the synthesis of maltose and maltosaccharides from α -D-glucopyranosyl fluoride, a stereoisomer of α -D-glucopyranose. The entire group of α -amylases had the capacity to promote α -D-glucosyl transfer from α -D-glucosyl fluoride to C₄-carbinol sites, demonstrating for the first time that α -amylases possess in common the capacity to catalyze glycosylation (i. e., glycosyl-hydrogen interchange) reaction extending beyond hydrolysis and its reversal. Similar *de novo* synthesis of maltosaccharides from α -maltosyl fluoride by α -amylases was also discussed.

各種 amylase (α -, β -, glucoamylase 等) は加水分解酵素として分類され、従来水解機作を中心に種々研究がなされてきた。その最近の成果は次の総説によくまとめられている^{1,2)}。一方これら各種の amylase が示す合成能に関する研究は非常に少ないように思われる。われわれは各種結晶 amylase を用い、それらが示す transglycosy-

lation 作用に関して興味ある知見を得た^{3~5)}。その結果をここでは便宜上、I. 結晶 α -, β -, glucoamylase の示す condensation 反応における transglycosylation 作用について、II. α -glucosyl fluoride および α -maltosyl fluoride を donor とした場合、各種起源の結晶 α -amylase の示す transglycosylation 作用について、の二部に分けて解説したい。なお本研究はアルバート・インシュタイン医科大学 (N. Y.) の E. J. HEHRE 氏および D. S. GENGHOF 氏との共同研究によるものである。

* 静岡大学教育学部生物学教室 (静岡市大谷 836)

I. 結晶 α -, β -, glucoamylase の示す condensation 反応における transglycosylation 作用について

実験材料ならびに方法

1. 使用結晶酵素ならびに基質

(i) 結晶 glucoamylase 標品: *Rhizopus niveus* から得た3回結晶品で、 α -amylase を含まず、超遠心ならびに電気泳動で単一像を与える標品(生化学工業製, lot 8505)を用い、この0.8 mgを80 μ lの0.02 M 酢酸緩衝液(pH 4.5)に溶解したものを使用酵素液とした。

(ii) 結晶 β -amylase 標品: 甘藷から得た結晶 β -amylase 標品(Worthington 社製, lot BA 9AA, 530 U/mg)を用い、この1.4 mgを70 μ lの0.02 M リン酸緩衝液(pH 6.5)に溶解したものを使用酵素液とした。

(iii) 結晶 α -amylase 標品: プタすい臓から得た2回結晶標品(Worthington 社製, lot AA 9DC, 586 U/mg)を用い、この1.7 mgを70 μ lの0.02 M リン酸緩衝液(pH 6.5)に溶解したものを使用酵素液とした。

(iv) 精製結晶 α - および β -D-glucopyranose: 活性炭カラムで不純物を除去して得た無水 D-glucose を出発物質として、結晶 α -D-glucopyranose, $[\alpha]_D^{25} = +112.3^\circ$ は Hudson 法⁶⁾により、また結晶 β -D-glucopyranose, $[\alpha]_D^{25} = +19.0^\circ$ は Behrend 法⁷⁾により調製した。これらをそれぞれ実際に酵素反応に使用する 0.02 M 酢酸緩衝液(pH 4.5)に溶解した際に、得られた変旋光係数は HUDSON ら⁶⁾が D-glucose の水溶液について得た値($k_1 + k_2 = 0.0173$)と非常に近似した値を示し、使用した上記酢酸緩衝液は変旋光の速度に影響を与えないことを確認した。

(v) 結晶 α - および β -maltose: 結晶無水 α -maltose [94% α -アノマー, 6% β -アノマーの混合物, $[\alpha]_D^{25} = +171^\circ$ (N, N-dimethylformamide 中)] は米国の J. HODGE 博士より提供された⁸⁾。また結晶 β -maltose monohydrate, $[\alpha]_D^{30} = +113.9^\circ$ は HEHRE ら⁹⁾の方法により、馬鈴薯アミロペクチンのアルコール沈殿画分を β -amylase 処理して調製した。

2. 反応生成物の分析

酵素反応は反応終了後直ちに一定量の dimethylsulfoxide (DMSO) を加え、100°C, 10 分間加熱し、反応を停止した。反応生成物の検出ならびに同定はペーパークロマトグラフィー法(PPC)を用いた。すなわち、ワットマン 3 MM ロ紙をあらかじめ実際に使用する展開溶媒を用い、下降法にて洗浄し、ロ紙に含まれる硝酸銀で発

色する不純物を除去した。反応終了後、このように前処理した9あるいは11 cm 幅のワットマン 3 MM ロ紙上にそれぞれ、30 mg (glucose の場合)あるいは38 mg (maltose の場合)の糖を含む反応混液を7.5あるいは9.5 cm 幅のバンド状に添着し、*n*-butanol : pyridine : water (6 : 4 : 3, V/V)を用い、下降法にて室温で30~32 時間展開した。この展開条件で、D-glucose は原線より約35 cm の距離まで移動した。

展開、乾燥後、ロ紙をその左右の両端から2 cm の幅で切りとり、それらを guide strip として、アセトン-硝酸銀のディップ法¹⁰⁾を用いて発色させ、反応生成物の移動距離を確認した。

次に未発色の中央部分(5あるいは7 cm)から、反応生成物に相当する糖区分のロ紙1 cm²あたり、0.4 ml の水を用いて、それぞれの生成物を溶出し、遠心分離後の上清1 mlあたりの総糖量を glucose として、フェノール硫酸法¹¹⁾を用いて定量した。さらに反応生成物の結合部位の configuration は、愛知教育大の沢井氏より提供された *Candida tropicalis* var. *japonica* の α -glucosidase (transglucosyl-amylase, 8000 U/ml)を用いて決定した。この酵素は α -glucobiose (isomaltose, maltose, nigerose, kojibiose)には作用するが、 β -glucobiose (gentiobiose, cellobiose, laminaribiose, sophorose)には全く作用しないという特異性を持っている^{12,13)}。

実験結果

1. glucoamylase の condensation 作用

glucoamylase [EC 3.2.1.3]の逆合成作用に関して、これまで高濃度の化学的に単一でない isomer の混合物である D-glucose をその基質として用い、非常に長時間の酵素反応を行なわせることによって、主生成物として isomaltose の合成が報告されてきた。われわれは従来とは異なるアプローチとして、この酵素の condensation 作用の donor として、glucopyranose の精製結晶 α - および β - アノマーをそれぞれ別個に用い、従来に比し、極度に短時間の酵素反応を行なわせることによって、反応中に生ずる基質の変旋光を限定し、興味ある結果を得た。

すなわち、80 μ l の *Rhizopus niveus* の結晶 glucoamylase (0.8 mg 相当)を精製 β -D-glucopyranose (30 mg)に30°C, 2, 6, 15 分間それぞれ作用させたときに得られ

Fig. 1. Pairs of AgNO_3 stained chromatogram guide strips from mixtures of crystalline glucoamylase (GAm) incubated with β - or α -D-glucopyranose at 30°C for 2, 6, or 15 min, and from controls of inactivated enzyme (Δ GAm) plus the β - or α -D-glucose.

た反応生成物のペーパークロマトグラムが Fig. 1 の左側のシリーズで、同量の酵素を α -D-glucopyranose (30 mg) に同時作用させたときの反応生成物のクロマトグラムが Fig. 1 の右側のシリーズである。

対照として glucose の各アノマーに熱失活させた同量の酵素(図の Δ GAm)を加えたものを用いた。図から明らかなように glucoamylase は特異的に β -D-glucopyranose に作用して、 30°C , 2 分間で、実際に分離可能な量の maltose を急速に合成し、次いで isomaltose を徐々に合成することが判明した。

これらの反応生成物を展開後のロ紙より、それぞれ別個に溶出し、マーカーの各種 α -glucobiose と同時に PPC を行なったところ、それぞれマーカーの maltose, isomaltose の移動位置と一致し、さらに *Candida* の α -glucosidase を作用させるとそれぞれ完全に加水分解され、その結果 glucose のみを与えたことから、結合部位の configuration は α 型であることがわかった。さらに最も急速に合成される生成物はそのペーパークロマトグ

ラム上 diphenylamine-aniline¹⁴⁾ で 1,4 結合の glucobiose に特徴的な青色に呈色した。以上の事実からこの反応で最も急速に合成される生成物とそれにつづくものは、それぞれ maltose および isomaltose と同定された。

次に Fig. 2 は α - および β -D-glucopyranose に、それぞれ別個に glucoamylase を作用させ、 α -glucobiose の合成を経時的に追跡定量したものである。図から β -D-glucopyranose が特異的にこれらの glucobiose の合成に利用されていることは明らかである。 α -D-glucopyranose からわずかにこれらの二糖類が合成されるのは、時間経過に伴う変旋光の結果生じた少量の β -D-glucopyranose が利用されたものであると解釈できる。さらに別個に溶出されたそれぞれの生成物の収量を求めると、 β -glucose を基質にしたときに合成される maltose 量は 2, 6, 15 分反応で、それぞれ 186, 228, 246 μg で、isomaltose の合成量は同上の反応時間で、それぞれ 6, 66, 84 μg であった。また α -glucose を基質にしたときに合成される maltose 量は同上の反応時間で、それぞれ 27,

Fig. 2. α -Glucobioses (maltose plus isomaltose) synthesized by action of glucoamylase from 30 mg of initially pure β -D-glucopyranose (—●—) or 30 mg of initially pure α -D-glucopyranose (—○—). Determinations¹¹⁾, made on eluates from maltose and isomaltose sections of chromatograms, were corrected for background carbohydrate in corresponding sections of chromatograms of mixtures with inactivated enzyme plus α - or β -D-glucose. Content of β -D-glucose in the mixtures (---) with time was estimated from the mutarotation coefficient⁶⁾ for D-glucose at 30°C.

51, 93 μ g で, isomaltose の合成量はそれぞれ 0, 12, 15 μ g であった。従来から, *Rhizopus* の結晶 glucoamylase の逆合成生成物中に maltose は存在しないといわれてきたが, 上述の実験結果からわれわれは, glucoamylase は特異的に β -D-glucose を利用して, 非常に短時間 (2 分間) で最も急速に maltose を合成することを見いだした。

われわれのこの実験終了後, ほぼ時を同じくして渡辺ら¹⁵⁾は純化した *Rhizopus niveus* ならびに *Endomyces* sp. の glucoamylase を D-glucose に長時間 (4 日間) 作用させ, その際生成した各種の α -glucosaccharide 中に maltose の存在をその結晶酢酸塩として報告している。

このように glucoamylase の condensation 作用により, β -D-glucose から maltose が急速に合成されるが, Fig. 1 および上述の反応生成物の収量から判断して, この合成反応は非常に短時間内に平衡に達するように思われる。この点を確認するため, Fig. 1 で用いたものと全く同量の glucoamylase と β -D-glucose の反応混液を 30°C で 15 分, 5 時間, 24 時間それぞれ作用させ, 反応終了後その等量をそれぞれワットマン 3 MM ロ紙にスポットし, 展開後発色させたペーパークロマトグラムが Fig. 3 である。

Fig. 3. Saccharides produced in β -D-glucopyranose-glucoamylase mixtures kept at 30°C for 0.25, 5 and 24 hr. Material spotted for chromatography contains the products formed from a comparable amount of D-glucose (2.7 mg) in each case. S: α -Glucobiose standards.

この図から maltose は 15 分反応にくらべるとややその量は少ないが, 5 時間ならびに 24 時間の反応混液中にも明瞭にその存在が認められた。一方 isomaltose は 15 分反応ではごく少量が合成されるにすぎないが, 反応時間が延長されるにつれ蓄積される傾向にあった。15 分, 5 時間, 24 時間の各反応時間に 30 mg の β -D-glucose から合成された maltose の量はそれぞれ 0.25, 0.18, 0.165 mg であり, 一方上記反応時間に合成された全 glucosaccharide の量はそれぞれ 0.30, 1.2, 3.1 mg であった。これらの値と反応混液中の水の濃度 (44.4 M) をもとにして,

$$K_{eq} = \frac{[\text{maltose}][\text{H}_2\text{O}]}{[\beta\text{-D-glucopyranose}][\text{D-glucose}]}$$
から求めた各反応時間における平衡定数を Table 1 にまとめた。

Table 1 より非常に短時間 (15 分) で平衡定数が, 約 0.13 というほぼ一定値に達していることから, この glucose の condensation による maltose の合成反応は, 用いられた実験条件下ではかなり速やかに進行しているものと思われる。

なお *Rh. niveus* の glucoamylase は澱粉, グリコーゲン, マルトオリゴ糖をほぼ完全に glucose 単位で水解し, さらに maltose を isomaltose にくらべ 20~30 倍速やかに水解することが知られている^{16,17)}。得られた実

Table 1. Apparent equilibrium in the condensation of D-glucose to maltose by glucoamylase.

Incubation at 30°C	Concentration in reaction mixture:			K _{eq}
	D-Glucose ^a (moles/liter)	β -D-Glucopyranose ^b (moles/liter)	Maltose (moles/liter)	
15 min	1.65	1.39	6.9×10^{-3}	0.13
5 hr	1.60	1.02	5.0×10^{-3}	0.14
24 hr	1.49	0.95	4.6×10^{-3}	0.14

^a Calculated from the difference between 30 mg β -D-glucose initially present (in 100 μ l) and the sum of all saccharides synthesized.

^b Estimated from the total D-glucose concentration by the mutarotation coefficient, $k_1 + k_2 = 0.0173$.

験結果は上述の水解能にもとづいた glucoamylase の基本的な性格をその逆合成作用においてもそのまま反映しているといえよう。最も重要なことは glucoamylase が β -D-glucopyranose を特異的に donor として要求し、他の D-glucose 分子を acceptor として maltose, isomaltose を合成する際 configuration の変換を伴うということである。すなわち donor である β -D-glucopyranose は合成された maltose あるいは isomaltose の分子内では α 型をとる。さらにこの condensation 反応のメカニズムは、donor の D-glucopyranosyl 部分が acceptor である他の D-glucose 分子の C₄-あるいは C₆-carbinol の水素と相互変換したもの（すなわち glucosyl transfer）と

理解される。この反応の作用様式が Fig. 4 に示されている。

2. α -および β -amylase の condensation 作用

glucoamylase の condensation メカニズムに関して、上述のようないくつかの新たな注目すべき事実が判明したので、次に α -および β -amylase についてその condensation 作用の有無を検討した。これらの amylase は、従来からその水解機作を中心に詳細に研究されてきた^{18~21}。一方その合成能に関する研究はほとんど無く、ただその作用の存在性を簡単に示唆した 2, 3 の報告があるが^{22~25}、そのいずれも donor の configuration やその反応のメカニズムに言及したものではない。

Fig. 4. The synthesis (and hydrolysis) of maltose and isomaltose by glucoamylase. β -D-glucopyranose is specifically required in the condensations leading to the 1,4- and 1,6- α -glucobioses, and is quantitatively formed from the nonreducing unit of each disaccharide on hydrolysis⁴³). The configurational inversion indicates that, in condensation, the D-glucopyranosyl portion of β -D-glucopyranose is interchanged with hydrogen at the C₄ or C₆ carbinol site of a second D-glucose molecule.

Fig. 5. AgNO_3 stained chromatogram guide strips from mixtures of crystalline β -amylase (βAm) incubated with β - or α -maltose at 30°C for 3, 8, or 15 min, and from controls of inactivated enzyme ($\Delta\beta\text{Am}$) plus the β - or α -maltose.

われわれはまず β -amylase [EC 3.2.1.2] の condensation 作用をとりあげた。その理由としてこの酵素は glucoamylase と同様に、基質を水解する際その分子内の configuration の変換を伴って、非還元末端より β -maltose を生ずることが知られているからである²⁰⁾。したがってこの酵素の condensation 反応の donor には単に isomer の混合物である D-maltose ではなく、 β -maltose が特異的に利用されるであろうことが予想された。そこで $70\ \mu\text{l}$ の結晶甘藷 β -amylase 溶液 (1.4 mg 相当) を β -maltose (38 mg) に 30°C , 3, 8, 15 分間それぞれ作用させた。この際得られた反応生成物のペーパークロマトグラムが Fig. 5 の左側のシリーズで、同量の酵素を α -maltose (38 mg) に同時間作用させたときの反応生成物のクロマトグラムが Fig. 5 の右側のシリーズである。対照として maltose の各 α ノマーに熱失活させた同量の酵素 (図の $\Delta\beta\text{Am}$) を加えたものを用いた。図から β -amylase は特異的に β -maltose に作用して、 30°C , 3 分以内にかかなりの量の maltotetraose を急速に合成していることがわかる。一方、 α -maltose を基質とした場合 3 分反応では、ほとんど maltotetraose のスポットは認められず、さらに反応時間を延長しても maltotetraose の生成は非常に少量であった。このことは α -maltose 中にわずかに混在していた β -maltose と時間経過とともに変旋光を受けて生じた少量の β -maltose が、

この反応に利用されたものと解釈できる。すなわち、この反応の本質は、maltotetraose の合成に β -maltose のみが特異的に利用されるということである。

Fig. 6. Maltotetraose synthesized by action of sweet potato β -amylase from 40 mg of initially pure β -maltose $\cdot \text{H}_2\text{O}$ (—●—) or 38 mg of 94% α -(6% β -)anhydrous maltose (—○—). Determinations¹¹⁾ made on eluates from maltotetraose section of chromatograms were corrected for background carbohydrate in the corresponding section of chromatograms of mixtures with inactivated enzyme plus β - or α -maltose. Content of β -maltose in the mixtures (---) with time estimated from the mutarotation coefficient, $k_1 + k_2 = 0.0145$, for maltose at 30°C .

Table 2. Apparent equilibrium in the condensation of maltose to maltotetraose by beta amylase.

Incubation at 30°C	Concentration in reaction mixture:			K _{eq} ^c
	Maltose ^a (moles/liter)	β-Maltose ^b (moles/liter)	Maltotetraose (moles/liter)	
3 min	1.11	1.07	3.4×10 ⁻³	0.12
8 min	1.11	1.01	3.3×10 ⁻³	0.12
15 min	1.11	0.94	3.3×10 ⁻³	0.13

^a 40 mg β-maltose · H₂O in ca. 100 μl reaction mixture.

^b Calculated from the maltose concentration using the coefficient for mutarotation at 30°C ($k_1 + k_2 = 0.0145$) obtained by the van't Hoff equation⁶⁾ from reported coefficients for 0°C and 25°C⁴²⁾.

^c $K_{eq} = [\text{maltotetraose}][\text{H}_2\text{O}] / [\beta\text{-maltose}][\text{maltose}]$. The concentration of water in the reaction mixtures, 40.0 M, was used.

次に反応生成物を展開後の未発色の口紙より水にて溶出し、PPCを行なったところマーカである maltotetraose の移動位置と一致した。またこのものを少量の β-amylase で消化すると maltose のみを与え、さらに *Candida* の α-glucosidase により完全に加水分解されてその結果 glucose のみを与えたことから、結合部位の configuration は α 型であることがわかった。これらの事実を総合し、この反応生成物は maltotetraose であると同定された。

次に Fig. 6 は α- および β-maltose に β-amylase を作用させ、maltotetraose の合成を経時的に追跡定量したものである (実験方法は glucoamylase の condensation 反応の場合と全く同様である)。図から β-maltose が特異

的に maltotetraose の合成に利用されていることは明らかである。すなわち 3 分間の反応で与えた β-maltose から約 0.25 mg の maltotetraose が合成され、一方 α-maltose からは僅かに約 0.06 mg しか合成されていない。

さらに β-maltose から maltotetraose が合成される反応は非常に短時間内にその平衡に達するであろうことが、Fig. 6 から容易に想像される。そこで各反応時間に合成された maltotetraose 量と、反応混液中の水の濃度 (40.0 M) をもとにして、

$$K_{eq} = [\text{maltotetraose}][\text{H}_2\text{O}] / [\beta\text{-maltose}][\text{D-maltose}]$$

から求めた各反応時間における平衡定数が Table 2 にまとめられている。

Table 2 より非常に短時間 (3 分) で平衡定数が、約

Fig. 7. The synthesis (and hydrolysis) of maltotetraose by β-amylase. β-maltose is specifically required for the condensation to the 1,4-linked α-glucosaccharide; is quantitatively formed from the nonreducing end of maltotetraose on hydrolysis²⁰⁾. The configurational inversion indicates that, in condensation, the maltosyl radical of β-maltose is interchanged with hydrogen at the C₄ carbinol site of the nonreducing unit of a second maltose molecule.

Fig. 8. Chromatogram guide strips from mixtures of crystalline hog pancreatic α -amylase (α Am) incubated (30°C , 10 min) with α - or β -maltose, and from controls of inactivated enzyme ($\Delta\alpha$ Am) plus α - or β -maltose. The highly disproportionate formation of maltotetraose and maltotriose in the α -maltose vs. β -maltose mixture is clearly apparent. The trisaccharide is apparently a secondary product (along with D-glucose) of hydrolysis of the tetraose.

0.12 というほぼ一定値に達していることから、この maltose の condensation による maltotetraose の合成反応は、用いられた実験条件下ではかなり速やかに行なわれているものと思われる。ここで得られた $K_{eq}=0.12\sim 0.13$ という値は、glucoamylase による β -glucose から maltose が合成された際に得られた K_{eq} の値 (Table 1 参照) と非常に近似したものであった。

重要なことは β -amylase が β -maltose を特異的に donor として要求し、他の maltose 分子を acceptor として maltotetraose を合成する際、glucoamylase の condensation 作用で観察されたように、configuration の変換を伴うということである。すなわち donor である β -maltose は合成された maltotetraose の分子内では α 型をとる。さらにこの condensation 反応のメカニズムは、donor の D-maltosyl 部分が acceptor である他の D-maltose 分子の C_4 -carbinol の水素と相互変換したもの (すなわち maltosyl transfer) と理解される。この反応の作用様式が Fig. 7 に示されている。

ひきつづきわれわれは α -amylase [EC 3.2.1.1] の condensation 作用を検討した。70 μl のブタすい臓結晶 α -amylase 溶液 (1.7 mg 相当) を α - および β -maltose (38 mg) に 30°C , 3, 10 分間それぞれ別個に作用させた。

反応終了後 glucoamylase, β -amylase の場合と全く同様な方法で反応混液を熱失活させ、PPC を行ない反応生成物を分析定量した。その際のクロマトグラムが Fig. 8 に示されている。 α -maltose を用いた場合、maltotriose と maltotetraose が短時間で急速に合成されていることがこの図からわかる。

Table 3. Rapid synthesis of maltotetraose from α -maltose by crystalline hog pancreatic α -amylase.

Anomer tested ^a	Incubation at 30°C (min)	Content in incubated mixture:		
		α -Maltose ^b (mg)	Maltotetraose ^c (mg)	Maltotriose ^c (mg)
α -Maltose	3	33.4	0.18	0.13
"	10	29.4	0.17	0.39
β -Maltose	3	1.5	0.00	0.02
"	10	4.3	0.03	0.18

^a Enzyme added to 38 mg of anhydrous α -maltose (94% α -, 6% β -anomer), or to 40 mg β -maltose $\cdot \text{H}_2\text{O}$, in ca. 100 μl reaction mixture.

^b Estimated by use of the mutarotation coefficient, $k_1+k_2=0.0145$.

^c Assayed^[11] in water eluates from chromatograms of test mixtures; values corrected for carbohydrate from corresponding section of control chromatograms (heated enzyme+maltose).

さらに Table 3 に示されているように、 α -maltose の場合反応生成物である maltotriose, maltotetraose の合計量が3分反応で 0.31 mg, 10 分反応で 0.56 mg であった。これらの事実から、 α -amylase も β -amylase と同様に maltose からマルトオリゴ糖の合成を触媒することができ、この場合 α -maltose が donor として特異的に利用されることが判明した。

Table 3 からわかるように α -maltose 混液の場合、3 分間反応で G_4 (maltotetraose) 対 G_3 (maltotriose) の量比が、 $G_4/G_3 \approx 6/4$ であるのに対し、10 分間反応ではこの比の値が $3/7$ に低下している。しかし全く同様な実験を酵素量をやや減じて (1.6 mg) 行なうと、3 分間反応で $G_4/G_3 \approx 7/1$ となり、10 分間反応でも G_4 量の

ほうが G_3 量をやや上回っていることが判明した。

この事実は、次のように理解されるものと思われる。すなわち maltotetraose がこの反応の主生成物であり、これは donor である α -maltose のヘミアセタール水酸基と acceptor である maltose 分子の C4-carbinol との間で特異的に condensation が行なわれ、その結果 maltotetraose が合成されたものと理解される (この反応のメカニズムは maltosyl transfer である)。condensation の結果生じた maltotetraose がさらに水解され、二次的に maltotriose が生じたものと思われる。このことは、Fig. 8 に示されたクロマトグラムで、 α -maltose の 10 分間反応の結果かなりの量の glucose が生じていることからもうなづける。

II. α -glucosyl fluoride および α -maltosyl fluoride を donor とした場合、各種起源の結晶 α -amylase の示す transglycosylation 作用について

α -amylase [EC 3.2.1.1] はその酵素番号が示すように、グリコシル化合物に作用する水解酵素として第1番目にリストされている。したがって α -amylase は“D-glucose の α -1,4 結合に特異的に作用し、その結合を加水分解する酵素”と定義されてきた。

一方 α -amylase の糖転移作用については、1961 年松原²⁷⁾ が Taka amylase A が phenyl あるいは *p*-nitrophenyl α -maltoide からアルコールへの transmaltoisidation 作用を報告しており、また万谷ら²⁸⁾、吉田ら²⁹⁾ は *B. subtilis* の糖化型 α -amylase (BSA) が maltose から α -D-glucosyl transfer を行なうと報告している。同様な作用が他の起源の α -amylase にも存在するかどうかは不明であった。さらに上述のように、われわれはブタすい臓結晶 α -amylase がその condensation 作用により、 α -maltose から maltotetraose を合成することを見いだした (α -maltosyl transfer)。

これと時を同じくして ROBYT ら^{24,25)} もわれわれと同一起源の α -amylase を用いて、maltotriose, maltotetraose からの condensation 作用を報告している。これらの condensation 反応はすべて glycosyl 基と水素の相互変換反応として説明できるものである。またマルトオリゴ糖からの glycosyl transfer について 2,3 の報告^{23,30,31)} があるが、これは α -amylase の示す水解作用の逆反応として解釈できるものである。PAZUR ら³²⁾ は各種粗 α -amylase 標品中に特殊な“glucanosyl transferase”の混在を報告している。

しかし現在まで、各種の α -amylase がその水解作用

や逆合成作用を越えて glycosylation 反応そのものを行なうという報告はない。われわれは各種起源の結晶 α -amylase が glycosylation 反応そのものを触媒する能力の有無を検討し、2,3 の興味ある事実を見いだした。

まず α -amylase の glycosylation 反応の基質を選択する際、これまで水解反応の機作解明に用いられたアミロ多糖や condensation 反応の基質となるマルトオリゴ糖を除外した。先に得た結晶 α -amylase が α -maltosyl transfer によって、 α -maltose から condensation 作用により急速に新たな α -1,4 結合を形成するという事実から、反応途上容易に水解される基質よりむしろ水解反応の最終生成物か、もしくはそれに類似したものがよりいっそう適切な基質となるであろうと判断した。

前述の α -amylase の condensation 作用における glycosyl transfer 作用は、従来からの知見である“ある一つのグリコシド結合と他のグリコシド結合との間の交換反応”としては理解できないものである。したがって glycosylation 反応の donor は本質的にグリコシド結合をその分子内に持つ必要はないのである。

そこでわれわれはこの目的のため α -glucopyranose とごく近似した立体構造を有する α -glucopyranosyl fluoride を用いることにした。この化合物はいわゆるグルコシドではなく混合アセタールである。F 原子の共有結合半径が glucose の -OH 基に比しやや小さいが、その分子構造から見て α -D-glucose が適合できるような酵素の部位には、この化合物もまた適合するであろうことは容易に想像されるところである。さらにこの化合物には

glycosyloxy 基が存在しないので、反応によって得られる生成糖は純粋な glycosylation 作用の結果生じたものであると判断される。

実験材料ならびに方法

1. 使用結晶酵素ならびに基質

6 種の相異なる生物起源を有する高度に純化精製された結晶 α -amylase 標品を用いた。

(i) ブタすい臓から得た 2 回結晶 α -amylase (Worthington 社製, lot AA9DC および AAOGC)。

(ii) *Aspergillus oryzae* から得た 3 回結晶 Taka amylase A。この標品は超遠心ならびに電気泳動で単一像を与えるものである (三共製薬製, lot OE 2)。

(iii) *Bacillus subtilis* から得た 2 回結晶熱安定型 α -amylase。この標品は Sephadex を用いるゲルろ過で均一性を示す標品である (大和化成製, lot 800085)³³⁾。

(iv) *Bacillus subtilis* var *amyloliquefaciens* Fukumoto から得た 2 回結晶糖化型 α -amylase (BSA) (生化学工業製, lot 8405)。

(v) *Bacillus subtilis* var *amyloliquefaciens* Fukumoto から得た 3 回結晶液化型 α -amylase (BLA) (生化学工業製, lot OP 23)。

(vi) *Bacillus stearothermophilus* Donk, strain BS-1 から得た 2 回結晶耐熱性 α -amylase。この標品は超遠心、電気泳動、ゲルろ過で均一性を示すもので長崎大の小笠原氏より提供された³⁴⁾。

これら 6 種の微生物起源の結晶 α -amylase をそれぞれ冷 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 5.6) に溶解し、またブタすい臓 α -amylase は 0.003 M CaCl_2 を含む 50% 飽和 NaCl 中に保存した標品であったので、これを高速遠心で分離し、0.05 M maleate 緩衝液 (pH 6.5) に溶解し使用に供した。

なおこれらに加えて、ヒトの粗唾液 α -amylase (0.05 M maleate 緩衝液 (pH 6.5) で 1:10 に希釈したもの) を用いた。

(vii) α -D-glucopyranosyl fluoride: 基質として使用した α -D-glucopyranosyl fluoride は D-glucose pentaacetate を無水 HF 溶液と -20°C で反応させ^{35,36)}、その結果得られた結晶 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosyl fluoride (収率約 60%) をメタノール中ナトリウムメトキシドを用いて脱アセチル³⁷⁾、得られた生成物はメタノールから 3 回再結晶し、精製 α -glucosyl fluoride, $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +88^\circ$ ($c=2$, H_2O) を得た。ついで glucose oxidase 法を用い、この純度を検討したところ約 3% の glucose

が含まれていた。

(viii) α -maltosyl fluoride: α -maltosyl fluoride は再結晶した β -maltose octaacetate³⁸⁾, $[\alpha]_{\text{D}}^{26} = +63.1^\circ$ ($c=3$, CHCl_3) を無水 HF 溶液と -15°C で反応させ、hepta-O-acetyl- α -maltosyl fluoride, $[\alpha]_{\text{D}}^{26} = +106^\circ$ ($c=2$, CHCl_3) を得た。

これをメタノール中バリウムメトキシドを用いて脱アセチル³⁹⁾、バリウムイオンは Amberlite IR-120 (H^+) にて除去し、乾燥粉末とした。このものは β -amylase あるいは希酸で処理すると maltose と HF を与えるが、不純物としてかなりの量の maltose、わずかな量の glucose および 2,3 のこん跡程度の未同定の糖を含んでいたもので、ワットマン No.1 ロ紙を用いて PPC を行ない、これら不純物を除去した。このようにして最終的に精製した α -maltosyl fluoride, $[\alpha]_{\text{D}}^{31} = +105.8^\circ$ ($c=1.3$, CH_3OH) を得た。

2. 反応生成物の分析

D-glucose は glucose oxidase 法により (Worthington 社製, glucostat 試薬を使用、このものは α -amylase を全く含んでいない)、400 m μ における吸光度として比色定量した。

Fluoride は MEGREGIAN および MAIER の方法⁴⁰⁾を多少変更して用い、525 m μ における吸光度として比色定量した。

実験結果

異なる生物起源を有する 6 種の結晶 α -amylase 溶液 100 μl (0.1 mg 相当) を、それぞれ別個に 20 μmoles の α -D-glucosyl fluoride に 30°C 、10 分間作用させた。対照として、個々の 20 μmoles の α -maltose, β -maltose に同量の各 α -amylase を前記と全く同じ条件 (30°C 、10 分) で作用させた。酵素反応は反応終了後直ちに、加熱処理 (100°C 、10 分) することによって停止した。

各反応混液を 14 cm 幅のワットマン No.1 ロ紙に 12.5 cm 幅のバンド状に添着し、PPC を行なった。すなわち n -butanol : ethanol : water (4 : 1 : 5, V/V) を展開溶媒に用い、下降法にて室温で 55~63 時間展開した。この条件下で D-glucose は原線より約 20~22 cm の距離まで移動した。展開、乾燥後ロ紙の左右の両端から 2 cm 幅ずつ切りとり、それを guide strip としてアセトン-硝酸銀のディップ法を用いて発色させ、個々の反応生成物の移動距離を確認した。

個々の生成糖は未発色のロ紙の中央部分 (10 cm 幅) を細片とし、それぞれ 10 ml の水にてペトリ皿中で、

Fig. 9. Pairs of AgNO_3 -stained chromatogram guide strips from mixtures of hog pancreatic α -amylase and *B. subtilis* "saccharifying" α -amylase incubated with α -D-glucosyl fluoride (α -GF), α -maltose (α -G₂), or β -maltose (β -G₂). The pronounced D-glucose (G₁) area seen in all α -D-glucosyl fluoride mixtures is due to hydrolysis of this labile substrate on heat inactivation of the digests. α -D-Glucosyl fluoride itself migrates *ca.* twice as fast as D-glucose, and small surviving amounts were evident on a lower part of the chromatograms (not shown).

4時間室温にて時々攪拌し、さらに20時間4°Cに放置し溶出された。

結晶ブタすい臓 α -amylase および結晶 BSA を α -glucosyl fluoride, α -maltose, β -maltose にそれぞれ別個に作用させた際の結果を示すペアのクロマトグラムをそれぞれ Fig. 9 に示した。

まず左側と中央の結晶ブタすい臓 α -amylase を作用させたクロマトグラムに注目すると、この酵素は α -glucosyl fluoride に作用して少量の maltose, かなり多量の maltotriose, 少量の maltotetraose 等を合成しているが、 α -maltose, β -maltose には全く作用していない。これは、この反応に用いた基質および酵素が、前述の condensation 反応の時より非常に低濃度であったため、 α -maltose から condensation により maltotetraose の合成が見られないことを意味している。ちなみに α -glucosyl fluoride のクロマトグラム上に glucose のスポットが生じているのは酵素反応を加熱処理して停止した際、未反応の基質が熱分解を受けて生じたものである。

対照として熱失活させた酵素をこれら三種の基質に別

Fig. 10. Chromatogram guide strips from mixtures of *Aspergillus oryzae*, *B. subtilis* "liquifying", and thermostable *B. subtilis* α -amylases incubated with α -D-glucosyl fluoride, α -maltose, or β -maltose. The lightly stained area between maltose (G₂) and maltotriose (G₃) in the α -D-glucosyl fluoride digests is a minor impurity in the substrate and not a reaction product.

個に作用させたところ、マルトオリゴ糖の合成作用は三者において全く見られなかった。

次に右側のクロマトグラムは結晶 BSA を用いた際の実験結果であるが、 α -glucosyl fluoride からかなり多量の maltose, maltotriose, 少量の maltotetraose の合成が見られる。さらに非常に興味あることは α -maltose, β -maltose の両者から多量の glucose, maltotriose, 少量の maltotetraose の生成が見られることである。

起源の異なる他の三種の α -amylase についても、全く同様な実験を行なった。その結果が Fig. 10 に示されている。三者とも α -maltose, β -maltose には全くその作用を示さない。 α -glucosyl fluoride からは例外なく一連のマルトオリゴ糖の合成が見られる。 α -glucosyl fluoride のクロマトパネル中 maltose と maltotriose の間にかすかに見えるバンドは、 α -glucosyl fluoride 中にわずかに含まれる不純物である。

Taka amylase A においては非常に少量の maltose, maltotriose のみが合成されているが、これは他の amylase の場合とくらべて例外といえる。一方 BLA および *B. subtilis* の熱安定型 α -amylase においては、多量の maltose および少なくとも maltopentaose に至る一連の各オリゴ糖が多量に合成されているのがわかる。

Table 4. α -Glucosaccharide synthesis by crystalline α -amylase preparations: product yields from α -D-glucosyl fluoride vs α - and β -maltose.

α -Amylase	Substrate	α -Glucosaccharides formed in 10 min from 20 μ moles of substrate ^a				
		G ₂	G ₃	G ₄	G ₅	Total, as % of substrate
		μ g	μ g	μ g	μ g	
<i>A. oryzae</i>	Glucosyl fluoride	25	14	0	0	1.1
Hog pancreas	"	56	68	29	0	4.2
<i>B. stearothermophilus</i>	"	143	61	30	90	8.9
<i>B. subtilis</i> , heat stable	"	93	82	37	231	12.3
<i>B. subtilis</i> , liquifying	"	101	110	70	248	14.7
<i>B. subtilis</i> , saccharifying	"	376	222	5	0	16.8
" "	α -Maltose	—	608	81	0	9.6
" "	β -Maltose	—	513	58	0	8.0
All others	α - or β -Maltose	—	—	—	—	0.0 ^b

^a As D-glucose released from the eluted saccharides by glucoamylase.^b Free D-glucose in the digests was not increased over the trace amounts in control mixtures of α -maltose and of β -maltose without enzyme.

さらにこの図には示されていないが、*B. stearothermophilus* およびヒトの唾液 α -amylase も同様に α -maltose, β -maltose には全く作用せず、*Bacillus* においては maltose~maltopentaose, 唾液においては maltose~maltotetraose の合成が見られた。

上述のように各種起源の α -amylase を α -glucosyl fluoride に作用させ、その結果生じた各マルトオリゴ糖量を別個に定量した結果を Table 4 に示した。これらは先の guide strip を切りはなした残りの未発色のクロマトパネル (各反応混液の 80% 相当) からそれぞれ溶出され、ついで *Rh. niveus* の glucoamylase で消化し、生じた glucose を glucose oxidase (Worthington 社製) を用いて定量した数値で、20 μ moles の基質に対する μ g 数で表わされている。

この表に示されているように、用いた全ての α -amylase が一連のマルトオリゴ糖のシリーズを α -glucosyl fluoride から生成している。その全収量は与えた基質に対する % として求めると、10 分間の反応消化物中 *A. oryzae* の Taka amylase A の 1% から、各種の *B. subtilis* の α -amylase の 12~17% に至るかなりの幅を持ったものである。

ここで用いた各種結晶 α -amylase が BSA の場合を除いて、 α -maltose, β -maltose に全く作用しないということは、いろいろ異なった方法で独立して純化精製され、結晶化されたこれらの α -amylase が α -glucosidase を含んでいないことを示している。したがって α -gluco-

syl fluoride に対する作用は、これら α -amylase そのものの作用にほかならない。

BSA によって α -maltose, β -maltose のそれぞれから多量の maltotriose, maltotetraose が合成されるという事実は、この酵素が α -D-glucosyl transfer により、maltose から maltotriose, maltotetraose を合成するという万谷ら²⁸⁾ の、また maltose を phenyl α -D-glucoside へ転移し、phenyl α -maltoside を合成するという吉田ら²⁹⁾ の報告と良く一致している。

ここで注目すべきは、BSA において、maltose からの glucosyl transfer が非常にユニークではあるが、試みられた全ての α -amylase は例外なく α -glucosyl fluoride に作用し、glucosyl transfer によって各種マルトオリゴ糖を合成しているという事実である。

次に各種 α -amylase が、基質である α -glucosyl fluoride をマルトオリゴ糖合成に利用する割合にくらべて、それを水解する割合がどの程度であるかを、熱失活させない反応混液を用いて検討した結果が Table 5 に示されている。

この場合 α -glucosyl fluoride は非常に熱に対して不安定な化合物であるから、加熱処理をしない反応混液を使用する必要がある。すなわち、60 μ moles の α -glucosyl fluoride に 0.3 ml の個々の α -amylase (30 μ g 相当) を 30°C, 2 時間作用させ、0 分と 2 時間後に生じた遊離の fluoride 量と glucose 量をそれぞれ別個に定量した。

表より明らかなように、いずれの場合も、glucose 量

Table 5. Proportions of free D-glucose and of saccharide-bound D-glucose in digests of α -D-glucosyl fluoride with various α -amylases.

α -Amylase	% Glucosyl fluoride accounted for as:		
	Free fluoride ^a	Free D-glucose ^a	Glucosaccharides ^b
<i>B. stearothermophilus</i>	5.0	1.6	3.4
<i>B. subtilis</i> , thermostable	13.3	2.7	10.6
<i>B. subtilis</i> , liquifying	15.8	0.8	15.0
<i>B. subtilis</i> , saccharifying	23.7	8.5	15.2
Hog pancreas	9.9	2.2	7.7
Human saliva (1 : 10)	7.8	0.7	7.1
<i>Aspergillus oryzae</i>	8.4	6.9	1.5

^a Amount released on incubation (30°C, 2 hrs) calculated as μ moles per 100 μ moles glucosyl fluoride substrate.

^b Free fluoride less free D-glucose; this estimate does not include D-glucose linked to fluorine in any oligoglucosyl fluoride(s) present at the time of analysis.

よりもそれを上回る多量の fluoride が遊離されており、これらの値の差が α -glucosyl fluoride からマルトオリゴ糖へ変換された D-glucose 量に見合うものと考えられる。これらの値は Table 4 で得られた値とよく一致している。

この反応の場合、基質である α -glucosyl fluoride の濃度 (0.2M) は水の濃度の 1/275 で、この条件下では反応は水解よりもむしろ合成の方向に傾いていることを

示している。

加熱処理をほどこさない各種 α -amylase と α -glucosyl fluoride の反応混液中の生成物をさらに確認するために、前と同様の条件すなわち 30°C, 2 時間反応させた各反応混液 0.3 ml を 2 枚の 14 cm 幅のワットマン No. 1 ロ紙に 12.5 cm 幅のバンド状に添着し、PPC を行なった。前述と全く同じ展開溶媒を用い、乾燥後左右の guide strip をアセトン—硝酸銀のディップ法にて発色さ

Fig. 11. Chromatogram guide strips from uninactivated digests of α -D-glucosyl fluoride with different α -amylases. Digests with three of the enzymes (group A) contain maltosaccharides through the tetrasaccharide, and trace of co-migrating maltosaccharide 1-fluorides. Digests with the remaining four α -amylase preparations (group B) contain maltose and maltotriose but no detectable maltosaccharide 1-fluorides. A control substrate-buffer mixture (no enzyme), and a digest of α -D-glucosyl fluoride with crystalline *Rhizopus niveus* glucoamylase are included for comparison.

せたクロマトグラムを Fig. 11 に示した。

これらのクロマトグラム中、最も速く移動する物質(原線より 17.5~22 cm)は、未反応の α -glucosyl fluoride であり、次に D-glucose の位置に maltosyl fluoride が同時に移動して重なり合い、maltose の位置に maltotriosyl fluoride が、maltotriose の位置に maltotetraosyl fluoride がそれぞれ重なり合っているらしいことがわかった(この点に関しては後述する)。

得られた結果にもとづいて、われわれは α -glucosyl fluoride から、反応生成物として maltose, maltotriose, maltotetraose を与える *B. stearothermophilus*, *B. heat stable*, BLA の各 α -amylase をグループ A とし、また maltose, maltotriose のみを与える BSA, プタのすい臓、ヒトの唾液、Taka amylase A の各 α -amylase をグループ B と分類した。

反応生成物の確認のため、加熱処理をしない α -amylase と α -glucosyl fluoride との反応混液を直接 PPC にかけて、各生成オリゴ糖を分離した。それらを個々にメタノールで溶出し、28°C 以下で減圧濃縮し、その一部を 0.01 N の H_2SO_4 で 100°C、10 分間加水分解し、PPC にかけて。Fig. 12 はそれらのうちの *B. stearothermophilus* の α -amylase の場合を示してある。図の左側の 1, 1' はそれぞれ、合成された α -maltosyl fluoride と glucose の混合物を希酸で加水分解する前と後のクロマトグラムである。また 2, 2' は α -glucosyl fluoride にこ

Fig. 12. 1, 1': Mixture of chemically synthesized α -maltosyl fluoride and D-glucose, before and after hydrolysis by 0.01N H_2SO_4 (100°C, 10 min). 2, 2': "D-Glucose position material" eluted from chromatograms of *B. stearothermophilus* α -amylase digest of α -D-glucosyl fluoride, before and after hydrolysis under above conditions.

S: Designated standards.

の α -amylase を作用させた反応混液を PPC にかけて、展開し、glucose の位置に相当する部分から糖を溶出し、希酸分解をほどこす前と後のクロマトグラムであり、S はマーカーの glucose, maltose である。

図から明らかなように、glucose の位置に相当する部分から溶出したものを再クロマトしても glucose の位置にしか移動せず、このものを希酸でおだやかに水解すると、maltose の位置にかすかなスポットがあらわれる。この事実から glucose の位置に maltosyl fluoride が混在しているものと結論した。グループ A に属する他の α -amylase, *B. heat stable*, BLA も全く同様な結果を与えた。

さらにグループ A の α -amylase 作用の結果得られる反応生成物中、PPC で maltose, maltotriose の位置に移動するものを溶出し、それぞれを希酸水解すると、わずかに maltotriose, maltotetraose が見られ、このことは maltose, maltotriose の位置に maltotriosyl fluoride, maltotetraosyl fluoride がそれぞれ混在していることを示している。

一方グループ B に属する α -amylase, すなわち BSA, プタのすい臓、Taka amylase A の各反応生成物をそれぞれ希酸水解しても、maltosaccharide 1-fluoride の存在は見いだされなかった。グループ A, グループ B の α -amylase のこのような性質の違いは興味あることと思われる。

上述のようにグループ A の反応生成物中に α -maltosyl fluoride の存在を確認したので、このものは α -glucosyl fluoride よりもさらに有効な基質となるであろうと考え、これを合成し使用した。この場合 α -maltosyl fluoride の濃度を α -glucosyl fluoride を用いた場合より低濃度とした。すなわち 1.8 μ moles の α -maltosyl fluoride に各種 α -amylase を、 α -glucosyl fluoride に作用させた時の濃度の 1/10~1/100 という低濃度で作用させた結果を Fig. 13 に示した。

この図より、まず第一に作用させた 7 種の α -amylase は例外なく、全てマルトオリゴ糖のシリーズを合成しており、そのうちの 5 種は少なくとも maltohexaose レベルまで合成している。さらに図の 4~7 に示されているように、これらの α -amylase は、 α -glucosyl fluoride に作用させたときに比べ、1/10~1/100 の低濃度で α -maltosyl fluoride からの glycosylation 反応を触媒していることがわかる。注目すべきことは、 α -glucosyl fluoride に 100 μ g/ml という酵素濃度を用い作用させた際、マルトオリゴ糖の合成能が最も微弱であった Taka

Fig. 13. Maltosaccharide synthesis from α -maltosyl fluoride by α -amylases. Mixtures (100 μ l) contained 1.4 mg substrate (α -maltosyl fluoride, 1.8 μ moles) and α -amylase in 0.05 M pH 5.5 acetate buffer (or buffer alone). After incubation (30°C, 30 minutes) 15 μ l of each mixture was chromatographed.

- 1=cryst. *B. subtilis* liquifying α -amylase, 100 μ grams/ml.
- 2=cryst. *B. subtilis* heat-stable α -amylase, 100 μ grams/ml.
- 3=cryst. *B. stearothermophilus* α -amylase, 100 μ grams/ml.
- 4=cryst. hog pancreatic α -amylase, 10 μ grams/ml.
- 5=human saliva, 1 : 250 dilution.
- 6=cryst. *Asp. oryzae* α -amylase, 1 μ gram/ml.
- 7=cryst. *B. subtilis* saccharifying α -amylase, 1 μ gram/ml.
- C=control of α -maltosyl fluoride incubated without enzyme.
- S=authentic maltohexaose, maltotetraose, maltose standards.

amylase A は、1 μ g/ml という低濃度で α -maltosyl fluoride に作用し、多量のマルトオリゴ糖のシリーズを合成していることである (図の6)。

第二に全ての反応において、対照にくらべて maltose 量が多いが、明らかにその maltose 量よりも合成されたさらに重合度の高いマルトオリゴ糖量のほうが多いものと思われる。この点を図の1の BLA を用いた際の反応

生成物について確認した。すなわちこれら個々の合成されたマルトオリゴ糖をロ紙より別個に溶出し、それを *Rh. niveus* の結晶 glucoamylase で消化し、生じた D-glucose を glucose oxidase 法で定量した結果、基質である α -maltosyl fluoride の 6.9% が maltose, glucose に、その 31.5% がさらに重合度の高いマルトオリゴ糖に変換されていることがわかった。この場合反応は水解よりむしろ合成の側に傾いているものと思われる。

考 察

一般に carbohydrase の condensation 作用に関する研究は従来 configuration の不確定な糖を donor に用い、しかも非常に長時間にわたる酵素反応を行なうことが伝統的に行なわれてきた。しかしわれわれは、各種結晶 amylase の示す condensation 作用の機作を追求した際、この反応は donor に厳密なアノマー特異性を要求し、しかも正確なアノマーが用いられると反応は数分間という非常に短時間でも十分検出可能な程度進行することを見いだした。この事実と関連して ROBYT ら^{24,25} が α -amylase の condensation 作用について得た結果は、さらに次のようにいえよう。すなわち maltotriose, maltotetraose の α -アノマーのみが真の donor になり得て、 β -アノマーは donor にはなり得ない。

このように condensation 反応の donor には厳密なアノマー特異性が要求されるが、われわれの未発表のデータから判断すると、acceptor には donor ほど厳密な特異性は要求されず、 α , β いずれの configuration でも良いようである。

これまで糖転移反応のメカニズムは、ある一個のグリコシド結合と他のグリコシド結合との交換反応であると考えられてきた。しかし、われわれはこの反応を基本的には

というモデル^{1~3,41}) で示される反応であると考えている。すなわち各種の -X, -X' において、glycosyl 基と水素が相互変換する反応である。

今回われわれが得た glucoamylase の condensation 反応のメカニズムはまさに、glucosyl 基と水素との相互変換反応、すなわち glucosyl transfer であり、さらに α -amylase, β -amylase の示す condensation 反応のメカニズムは、maltosyl 基と水素との相互変換反応、すなわち maltosyl transfer であり、いずれも上述のモデルに適合するものである。したがって各種 amylase の示した condensation 反応のメカニズムは、glycosyl transfer 反

応の範疇にはいるものにほかならない。

次にわれわれは α -glucosyl fluoride ならびに α -maltosyl fluoride を用いて、各種の結晶 α -amylase がこれらの化合物を donor として、一連のマルトオリゴ糖のシリーズを合成することを観察した。この場合使用した結晶 α -amylase は、全て相異なる生物起源を有し、さらにそれぞれ別個の精製過程を経て、結晶化されたものであるから、その中に混在するかもしれない他の酵素作用によるものとは考えがたく、これら一連のマルトオリゴ糖の合成作用は α -amylase そのものによるものと考えられる。さらに BSA の特殊な場合を除いて、用いられた全ての結晶 α -amylase 標品は、 α -ならびに β -maltose に全く作用しないことから、maltase (α -glucosidase) の混在はないものと考えられる。

この酵素の加水分解作用の際、その特異性として基質に glucose の α -1,4 結合を絶対的に要求するが、今回合成されたものが全てマルトオリゴ糖であり、このことはこの酵素により新たに glucose の α -1,4 結合が形成されたことを意味している。これは α -amylase の glucose の α -1,4 結合に特異的であるという性格が如実に反映しており非常に興味深い点である。

われわれが分類したグループ A の α -amylase (*B. stearothermophilus*, *B. subtilis* heat stable, BLA) は、グループ B の α -amylase (BSA, プタのすい臓、ヒトの唾液, Taka amylase A) にくらべてより鎖長の長いマルトオリゴ糖のシリーズを合成している。このように α -amylase をマルトオリゴ糖の合成能の違いから分類したわれわれの結果は、岡田ら³¹⁾の各種 α -amylase を主としてそのマルトオリゴ糖に対する水解能の差異にもとづいて分類した結果と良く一致しており興味深い。

α -glucosyl fluoride からマルトオリゴ糖が合成されるメカニズムは、おそらく次のように説明されるであろう。すなわち最初の律速的な反応は、1分子の α -glucosyl fluoride が α -D-glucosyl transfer 作用によって他の α -glucosyl fluoride 分子に転移され、 α -maltosyl fluoride が形成され、ひきつづきさらに急速な α -maltosyl transfer 作用によって、他の α -glucosyl fluoride 分子に転移され、その結果 α -maltotriosyl fluoride が形成される。この際おそらく、その一部は水に転移して(水解されて)、maltose を生ずる。同様な機作により、 α -maltotriosyl fluoride が α -maltotriosyl transfer 作用によって、さらに他の α -glucosyl fluoride 分子に転移され、その結果 α -maltotetraosyl fluoride が形成され、さらにその一部が水解されて maltotriose が生ずるのであろう。このよ

うなメカニズムが繰り返えされ、最終的にマルトオリゴ糖の鎖長が適当な長さになると、水解が起こり、結果として一連のマルトオリゴ糖のシリーズを与えるものと解釈される。

α -glucosyl fluoride を donor としてマルトオリゴ糖が合成される際、水の濃度は基質濃度の 275 倍であり、 α -maltosyl fluoride を donor とした場合水の濃度は実に基質濃度の 3000 倍以上であるにもかかわらず、水解作用よりも C4-carbinol への glycosylation 作用のほうが優先されていることになる。この反応のメカニズムもまた、先に述べた glycosyl 基と水素との相互変換反応(glycosylation 反応)に他ならない。

このように -F から C4-carbinol への α -D-glucosyl ならびに α -D-oligoglucosyl transfer 作用は、これまで α -amylase では全く知られておらず、このことは α -amylase がその水解能および逆合成能を越えて、glycosylation 反応を触媒することを意味しており、 α -amylase の触媒能の幅の広さを示している。そこでわれわれはこの α -amylase を単なる水解酵素と考えるよりも、むしろさらに幅広い触媒能を示す glycosylase と考えたい。

結 論

各種結晶 amylase の示す condensation 反応の機作を、donor に厳密に規定されたアノマーを用いて検討した。*Rh. niveus* の結晶 glucoamylase は、condensation 反応の donor に特異的に β -D-glucopyranose を要求し、急速に maltose を、徐々に isomaltose を合成した。甘藷結晶 β -amylase は特異的に β -maltose を、またプタすい臓結晶 α -amylase は特異的に α -maltose をその condensation 反応の donor に要求し、それぞれ急速に maltotetraose を合成した。しかも glucoamylase, β -amylase の condensation 反応の際、その donor は configuration の変換を伴い、合成反応に利用されることが判明した。

glucoamylase および β -amylase によって触媒される condensation 反応は、非常に速やかにその平衡に達するものと思われる。この両酵素の行なう condensation 反応において、本質的にほぼ等しい平衡定数(K_{eq} = 約 0.13) が得られた。これらの condensation 反応のメカニズムは、一種の glycosyl transfer 作用と解釈される。

次に6種の相異なる生物起源を有する結晶 α -amylase を α -glucosyl fluoride, α -maltosyl fluoride に作用させ、それらが一連のマルトオリゴ糖のシリーズを合成することを観察した。これは α -amylase が、その水解能およ

び逆合成能を越えて, glycosylation (glycosyl 基と水素の相互変換) 反応そのものを触媒することを意味しており, α -amylase の非常に幅広い触媒能が示された。

終わりに臨み, 貴重な *B. stearothermophilus* の結晶 α -amylase を提供していただいた長崎大学の小笠原京子博士に, *Candida* の α -glucosidase を提供していただいた愛知教育大学の沢井輝男博士に, また結晶 α -maltose を提供していただいた米国の John HODGE 博士に感謝の意を表する。

文 献

- 1) J. A. THOMA, J. E. SPRADLIN, S. DYGERT: In "The Enzymes" (P. D. BOYER, ed.), 3rd Ed., Vol. 5, p. 115. Academic Press, New York (1971).
- 2) T. TAKAGI, H. TODA, T. ISEMURA: In "The Enzymes" (P. D. BOYER, ed.), 3rd Ed., Vol. 5, p. 235. Academic Press, New York (1971).
- 3) E. J. HEHRE, G. OKADA, D. S. GENGHOF: *Arch. Biochem. Biophys.*, **135**, 75 (1969).
- 4) E. J. HEHRE, D. S. GENGHOF, G. OKADA: *Arch. Biochem. Biophys.*, **142**, 382 (1971).
- 5) E. J. HEHRE, G. OKADA, D. S. GENGHOF: *Advances in chemistry series* (1973) (印刷中).
- 6) C. S. HUDSON, J. K. DALE: *J. Am. Chem. Soc.*, **39**, 320 (1917), C. S. HUDSON, E. YANOVSKY: *J. Am. Chem. Soc.*, **39**, 1013 (1917).
- 7) R. BEHREND: *Justus Liebigs Ann. d. Chem.*, **953**, 106 (1907).
- 8) J. E. HODGE, J. A. RENDLEMAN, B. G. BAKER, H. F. ZOBEL: *Abstracts, 153rd Meeting Amer. Chem. Soc. C*, 7 (1967).
- 9) E. J. HEHRE, D. M. HAMILTON: *J. Biol. Chem.*, **192**, 161 (1951).
- 10) W. E. TREVELYAN, D. P. PROCTER, J. S. HARRISON: *Nature*, **166**, 444 (1950).
- 11) M. DUBOIS, K. A. GILLES, J. K. HAMILTON, P. A. REBERS, F. SMITH: *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956).
- 12) T. SAWAI: *J. Biochem.*, **45**, 49 (1958); **48**, 382 (1960).
- 13) H. SUZUKI, E. J. HEHRE: *Arch. Biochem. Biophys.*, **104**, 305 (1964).
- 14) S. SCHWIMMER, A. BEVENUE: *Science*, **123**, 543 (1956); R. W. BAILEY, E. J. BOURNE: *J. Chromatog.*, **4**, 206 (1960).
- 15) T. WATANABE, S. KAWAMURA, H. SASAKI, K. MATSUDA: *Stärke*, **21**, 18, 44 (1969).
- 16) J. H. PAZUR, T. ANDO: *J. Biol. Chem.*, **235**, 297 (1960).
- 17) K. HIROMI, M. KAWAI, S. ONO: *J. Biochem.*, **59**, 476 (1966).
- 18) K. MYRBÄCK, G. NEUMÜLLER: In "The Enzymes" (J. B. SUMNER, and K. MYRBÄCK, eds.), Vol. 1, p. 653. Academic Press, New York (1950).
- 19) W. J. WHELAN: In "Encyclopedia of Plant Physiology" (W. RUHLAND, ed.), Vol. 6, p. 154. Springer-Verlag, Berlin (1958).
- 20) D. FRENCH: In "The Enzymes" (P. D. BOYER, H. LARDY, and K. MYRBÄCK, eds.), 2nd Ed., Vol. 4, p. 345. Academic Press, New York (1962); E. H. FISHER, E. A. STEIN, p. 313.
- 21) 小林恒夫: 酵素ハンドブック (赤堀四郎監修), p. 456 (1966) 朝倉書店.
- 22) M. ABDULLAH, D. FRENCH: *Nature*, **210**, 200 (1966).
- 23) C. T. GREENWOOD, E. A. MILNE, G. R. ROSS: *Arch. Biochem. Biophys.*, **126**, 244 (1968).
- 24) J. F. ROBYT, D. FRENCH: *Federation Proc.*, **28**, 345 (1969).
- 25) J. F. ROBYT, D. FRENCH: *J. Biol. Chem.*, **245**, 3917 (1970).
- 26) J. A. THOMA, D. E. KOSHLAND, Jr.: *J. Biol. Chem.*, **235**, 2511 (1960).
- 27) S. MATSUBARA: *J. Biochem.*, **49**, 226 (1961).
- 28) 万谷司郎, 山本武彦, 福本寿一郎: アミラーゼシンポジウム, p. 95 (1967).
- 29) H. YOSHIDA, K. HIROMI, S. ONO: *J. Biochem.*, **66**, 183 (1969); **65**, 741 (1969); **62**, 439 (1967).
- 30) D. FRENCH, M. ABDULLAH: *Cereal Chem.*, **43**, 555 (1966).
- 31) S. OKADA, S. KITAHATA, M. HIGASHIHARA, J. FUKUMOTO: *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 900 (1969).
- 32) J. H. PAZUR, S. OKADA: *J. Biol. Chem.*, **241**, 4146 (1966); **243**, 4732 (1968).
- 33) B. HAGIHARA: *Ann. Rep. Sci. Osaka Univ.*, **2**, 35 (1954).
- 34) K. OGASAHARA, A. IMANISHI, T. ISEMURA: *J. Biochem.*, **67**, 65, 77 (1970).
- 35) D. H. BRAUNS: *J. Amer. Chem. Soc.*, **45**, 833 (1923).
- 36) F. MICHEEL, A. KLEMER: *Advan. Carbohydr. Chem.*, **16**, 85 (1961).
- 37) B. HELFERICH, K. BÄUERLEIN, F. WIEGAND: *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **447**, 27 (1926).
- 38) M. L. WOLFROM, A. THOMPSON: In "Methods of Carbohydrate Chemistry", (R. L. WHISTLER, ed.), Vol. 1, p. 334, Academic Press, New York (1962).
- 39) H. S. ISBELL: *Bur. Standards. J. Res.*, **5**, 1179 (1930).
- 40) S. MEGREGIAN, F. J. MAIER: In "Fluoride Drinking Waters" (F. J. MCCLURE ed.), p. 566. Public Health Service Publication No. 825, Bethesda, Md. (1962); *J. Amer. Water Works Ass.*, **44**, 239 (1952).
- 41) E. J. HEHRE: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **42**, 1713 (1960).
- 42) H. S. ISBELL, W. W. PIGMAN: *J. Res. Natl. Bur. Standards.*, **18**, 141 (1937).
- 43) S. ONO, K. HIROMI, Z. HAMAUZU: *J. Biochem.*, **57**, 34, 39 (1965).