マセランス酵素の作用機作とその利用

小 林 昭 一

(昭和 50 年 10 月 27 日受理)

Action Mechanisms of *B. macerans* Enzyme and Preparation of Cyclodextrins

Shoichi KOBAYASHI

National Food Research Institute
(1-4-12, Shiohama, Koto-ku, Tokyo, Japan)

B. macerans enzyme has been known by the name of BMA or cyclodextrin glycosyltransferase which has three different actions on α -1,4-glucan. These actions are cyclization, coupling and disproportionation. As these actions occur simultaneously, a fewer study of the mechanism of macerans enzyme actions has been done.

1) The author has studied on the action of macerans enzyme using various maltooligosaccharides and cyclodextrins (CDs) in order to prepare various CDs selectively, and tried to clarify some action mechanisms and action pattern. Cyclization proceeded as exo-type attack from non-reducing end of oligosaccharides. α -CD was easily transferred to $G_1 \sim G_4$ to form G_7 , G_8 ,---by coupling reaction at the initial stage of the reaction.

G_2 was the most effective acceptor in the maltodextrins we examined. The rate of coupling reaction of β -CD was extremely slower than α -CD. Disproportionation which is the transference between maltooligosaccharides showed a certain pattern in which primarily G_{n-2} moiety was transferred to another G_n molecule to form G_{2n-2} and G_2 .

From the experiments of the effects of complexing agents, we observed that the addition of SDS induced strongly the formation of α -CD from maltodextrin and other hand, β -CD was produced by the existence of Triton X-100. Stubbed CD which connected glucosyl, maltosyl---by α -1,6 linkage with CD was also formed by the addition of complexing agents such as SDS to branched substrates.

From the above results, the author inferred that the action pattern of macerans enzyme may be changed by the conformational change of substrate.

2) The author proposed a scheme of α, β -CD formation. Accumulation of β -CD by the prolonged period of the reaction was elucidated by the scheme.

3) A new method of CD preparation was proposed.

The principle of the method is that unreacted linear and branched dextrin in the macerans enzyme digest of starch are hydrolyzed to glucose by incubation with glucoamylase. CDs were fractionated by precipitation by addition of organic solvents such as acetone.

マセランス酵素は *Bacillus macerans* の生産する酵素であり、BMA または cyclodextrin glycosyltransferase とも呼ばれている。本酵素は、デンプン等、 α -1,4 glucan

の分子を端からまるめて切断結合する cyclization 反応を触媒する特異なものであるが、この他、acceptor となる糖の存在下でサイクロデキストリン (CD) を開環結合する coupling 反応、直鎖オリゴ糖間での転移反応である disproportionation 反応も触媒する^{1,2)}。マセラン

* 農林省食品総合研究所 (東京都江東区塩浜 1-4-12)

Fig. 1. The model of α -cyclodextrin.

H: hydrogen atom O: oxygen atom
C: carbon atom

Table 1. The properties of cyclodextrins.

	α -CD	β -CD	γ -CD
Glucose unit	6	7	8
Radius of cavity	6 Å	7~8 Å	9~10 Å
$[\alpha]_D^{25}(\text{water})$	+150.5°	+162.5°	+177.4°
Solubility*	14.5	1.85	23.2

* g/100 ml water, at 25°C.

ス酵素によって生成される CD は、主としてグルコース 6 個および 7 個から成る α , β -CD で、 α -1,4 結合をして環状構造をとっている (図 1)。したがって CD は糖の加水分解の際に末端を必要とする *exo* 型のアミラーゼに抵抗性を示す。また CD 分子の空隙は疎水領域、外側は親水領域となっている。この性質を利用して、各種油性物質を空隙内に取り込ませて包接化合物を作り、安定化、可溶化、乳化剤としての用途がある³⁾。CD は酵素類似反応を触媒する物質としても注目され⁴⁾、さらに BMA の coupling 反応で種々の多糖も調製される⁵⁾。CD の諸性質は表 1 に示すごとく、環の大きさによって異なるので、用途によって各種必要となる。本研究は、 α , β , γ などの CD を選択的に調製する方法の確立を目的としている。そのためには、マセランス酵素の作用機作に関する知見が必要であった。そこで、各種の手法を改良、考案して研究を進めてきた。

I. 実験手法の考案と改良

1) CD の定量法

α , β -CD を複合体形成試薬とともに沈澱させて測る重

量測定法⁶⁾もあるが、操作が煩雑である。そこで CD とマルトデキストリンの酵素に対する抵抗性の差異を利用した α , β -CD の分別定量法⁷⁾を考案して用いた。CD がグルコアミラーゼで分解されず、マルトデキストリンがグルコースに分解され、さらに CD が還元力を示さないで、グルコアミラーゼ処理後、還元力を測定して全糖から差し引いて総 CD 量を求める方法である。 α と β -CD の分別定量には、 β -CD が *Asp. niger* の α -アミラーゼの作用を受けやすいことを利用するか、またはペーパークロマトグラフィーで分離して定量する方法を用いた。

2) ペーパークロマトグラフィー

反応液を一定量スポットして高温上昇法で多重展開した。マルトオリゴ糖は硝酸銀発色によったが、多糖は還元力が弱いのでグルコアミラーゼ処理⁸⁾をして発色した。CD はヨウ素液を浸して発色した。適当な展開溶媒系を用いれば、CD は 2~3 重展開でよく分離し、おのおの CD はヨウ素発色で特徴ある色を現わした。 α は鮮明な青色、 β は黄色、 γ は茶褐色である。

3) マルトオリゴ糖の調製

基質として用いるマルトオリゴ糖は、カーボンカラム⁹⁾、Biogel P-2~6¹⁰⁾を用いて調製した。

4) マセランス酵素の精製

粗マセランス酵素は *Bacillus macerans* の培養液を遠沈した上澄液として得られるので、酵素蛋白以外の各種夾雑物質の除去、マセランス酵素の濃縮ができれば、次の精製段階への移行に便利である。本酵素は、通常の α -アミラーゼと同様にデンプンに吸着する¹¹⁾。この性質を利用して、硫酸溶液中で吸着する方法¹²⁾もあるが、ここでは粗酵素液にトウモロコシデンプンを加え、エタノールを添加して吸着させた。脱着は水とともに温浴で攪拌すれば効果的であり、40 倍に濃縮できる。こうして得られた酵素液は、透析の必要もなく、直接 DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィー、DEAE-cellulose 再クロマトにより、ディスク電気泳動で単一バンドにまで精製した。

II. マセランス酵素の作用機作

マセランス酵素が三反応を触媒することはすでに述べたが、この他、加水分解様反応も認められ、これらの反応が同時に進行するので、作用機作の解明は困難であった。従来、酵素量×反応時間の値が大きい場合、 β -CD/ α -CD の値は大きくなり、小さい場合は小さくなるという現象が知られていた¹³⁾。この現象を解明することによ

Fig. 2. α - and β -CD formation from soluble starch by BMA.

Width of band shows the contents (%) of cyclodextrin and maltodextrin.

り、 α , β -CD 生成の制御が可能になると考えた。

1) 可溶性デンプンからの CD 生成経時変化

可溶性デンプンにマセランス酵素を作用させて経時的に α , β -CD を定量して図 2 に示した。 α -CD は反応初期に迅速に増加するが、後期には減少する。一方、 β -CD は α の減少分を補足するごとく増加する。総 CD 量は最終的には全糖の約 50% 程度となるが、さらに長時間反応では減少した。

2) α -CD から β -CD への転換

α -CD の純品をマセランス酵素に作用させた場合、図

Fig. 3. Interconversion of α -cyclodextrin to β -cyclodextrin and maltodextrin by the action of BMA.

Width of band shows the contents (%) of cyclodextrins and maltodextrin.

3 に示すごとくであった。 α -CD は徐々に分解されて還元オリゴ糖が生成されると同時に β -CD が現われた。また β -CD はマセランス酵素の作用を受けにくく、図 3 の条件下では分解されなかった。

3) オリゴ糖から α , β -CD の生成

G₃ (マルトトリオース) から G₁₂ までの糖からの生成糖をペーパークロマトグラフィーで検出して表 2 にまとめた。G₁, G₂ からは CD の生成は認められなかったが、G₃ 以上では認められ、G₇ 以上では α , β -CD が検

Table 2. CD formation from MD of various DP.

	G ₁	G ₂	G ₃	G ₄	G ₅	G ₆	G ₇	G ₈	G ₉	G ₁₀	G ₁₁	G ₁₂
α	—	—	±	+	+	++	+++	++++	+++	+++	+++	++++
β	—	—	—	—	—	±	+	+	++	++	+	±

—, no formation; ±, very slight formation; + ~ + + + +, degree of formation.

Table 3. Rate of coupling.

Coupling of CD (μ M/min/mg prot.)								
Acceptor	G ₁			G ₂	G ₃	G ₄	$\times 10^{-2}$ M	
	2/3	4/3	6/3	2/3	2/3	2/3		
α -CD	0.2	2.9	5.3	8.3	4.3	2.4	1.9	
β -CD	0	0	—	—	0.5	—	—	

The concentration of CD: $2/3 \times 10^{-2}$ mol.

CDs were coupled with each acceptor and the rate of coupling was determined by glucoamylase and Somogyi-Nelson method.

Fig. 4. Scheme of α , β -CD formation.

出された。G₉, G₁₀ では β -CD の生成量が多く、それ以上になると β -CD/総 CD 値は減少してくる。

4) α , β -CD の coupling 速度

G₁~G₄ についてのおおの coupling 反応の初速度を求めて表 3 に示した。 α -CD では同濃度で比較した場合、マルトースとの反応速度が最も早く、重合度の増加とともに減少している。 β -CD はマルトースとわずかに反応するが、グルコースとは反応しない。

II-1)~II-4) までの結果をまとめて図 4 のスキーム

II-4) から α -CD $\xrightarrow{G_{1\sim4}}$ MD, β -CD $\xrightarrow{G_2}$ MD となるので、これらを組み合わせてスキームを作製した。このスキームにより、従来のマセランス酵素による β -CD の蓄積が説明され、さらにスキームの利用により α , β -CD の選択的調製も可能となる。

5) 三反応の作用形式

G₇~G₁₂ までのオリゴ糖を用いて cyclization 反応を検討した。主反応はおおの糖から α -CD と切れ端を残し、さらに還元末端を ¹⁴C-グルコースでラベルした基質との反応で、切れ端に放射能をもち、 α -CD に放射能が認められないことから、cyclization 反応は非還元末端から exo 型におこることを明確にした。

さらに SDS のような複合体形成試薬によって、反応初速度が速くなる。表 4 に示したごとく、長鎖糖ほど SDS の添加効果が高くなっていく。生成 CD は α が主成分であった。

disproportionation 反応は、従来 at random な転移反応と言われていたが、一定のパターンが認められた。

Table 4. Rate of cyclization.

Subst.	Formation of CD (μ M/min/prot.)						
	SS	G ₁₀	G ₉	G ₈	G ₇	G ₅	1% final
-SDS	21	22	22	22	—	—	
+SDS	36	—	33	26	12	7	0.1% final

SS, soluble starch; -SDS, without sodium lauryl sulfate; +SDS, with sodium lauryl sulfate; concentration of substrate, final 1%; concentration of SDS, final 0.1%.

その主反応は、G_n (n は 4 以上) からの G_{n-2} 部分の非還元末端への転移である¹⁴⁾。

以上の結果と coupling 反応では G₂ が受容体として効果的であることから、分子内反応 (cyclization) と分子間反応 (coupling, disproportionation) との間の差異を二つに大別した。すなわち、前者は exo 型の分子内転移、後者は G₂ を介した分子間転移を主反応としている。

III. CD の新調製法¹⁵⁾

従来の CD 製法は、基本的には CD がテトラクロロエタンなどの有機溶媒と包接化合物を形成して沈殿する性質を利用したものである¹⁶⁾。CD の空隙内に適合する有機溶媒を取り込ませて、目的の CD を沈殿させる方法であるが、沈殿の濾過、水蒸気蒸留などの煩雑な操作を必要とし、長鎖糖が存在すると共沈して CD に混入する。新調製法は、CD と鎖状糖の酵素分解性の差を利用したものである。そのフローシートを図 5 に示した。CD は還元末端、非還元末端をもたないので、通常の exo 型酵素に作用されない。そこで、デンプンから CD を形成させた後、CD 以外の糖を少糖に分解して、CD と少糖の分離を試みた。CD はアセトンで非常によく沈殿して少糖は母液に残り、分離は容易であった。鎖状糖の分解酵素としてはグルコアミラーゼ、 β -アミラーゼがあるが、後者の酵素作用は CD によって阻害される¹⁷⁾ ので本法には不適當である。グルコアミラーゼは CD を分解しないが、標品によっては β -CD をわずかに分解するので、使用前に CD の純品と作用させてチェックする必要がある。グルコアミラーゼ処理によりデンプンのマセランス酵素反応液の組成はグルコースおよび CD となり、アセトン沈殿により CD の混合物が得られる。 α と β -CD の分離が必要な場合は、CD の混合物を少量の水に溶解して、低温放置により β -CD を晶出させ、

Fig.5. Flow sheet of isolation of cyclodextrins.

Fig.6. Crystals of α -cyclodextrin
(crystallized from a propanol soln.)

母液に n -プロパノールを加えて α -CD を晶出させて簡単に純品が得られる。図 6, 7 にはこのようにして得られた α および β -CD の結晶を示した。 α -CD はカエデ葉状, β -CD は方解石状で得られた。

IV. α および β -CD の選択的生成とその機作

マセランズ酵素では主として α, β -CD を生成するが、

Fig.7. Crystals of β -cyclodextrin
(crystallized from water)

用途, 精製操作の面から α, β -CD のいずれかを主生成物とすることが望ましい。図 3 から $SS \rightarrow \beta$ -CD, $MD \rightarrow \beta$ -CD の経路をブロックできれば α -CD が蓄積し, 逆に $SS \rightarrow \alpha$ -CD の経路をブロックすれば β -CD が主生成物になる。また高濃度デンプンを液化して用いれば, β -CD は容易に得られる。

β -CD が α -CD に比較して水に溶解難い性質を利用

して、高濃度基質から晶出させる方法である。同様にして、 α -CD も反応系外に取り出せば、 α -CD の生産は容易となる。 α -CD と複合体を形成する試薬を添加すればよいが、長鎖糖も多量に沈殿する。

マセランス酵素の他に、最近 β -CD を主として生成する megaterium^{12,18)} など、好アルカリ性細菌¹⁹⁾ の酵素が発見された。 α -CD を主として生成する酵素は未だ発見されていない。このように、 α , β -CD の選択的生成には大別して三つの方法、すなわち、① α , β -CD のいずれかを主として生成する特異的酵素の使用によるか、②生成した CD の系外除去によるか、または③作用機作の検討で得たスキームの生成経路を変化させることによる方法がある。

II-5) で得た知見から α -CD の調製を検討した結果では、 α -CD 生成量は用いたデンプンの 60% 以上になった²⁰⁾。SDS による α -CD 生成量増大効果は、基質の分子鎖が 6i-helical 構造をとるためと考えられる。通常の α -amylase は endo 型分解酵素なので SDS によって活性は阻害されるが、exo 型酵素に対する阻害は顕著でない²¹⁾。これらのことから、マセランス酵素は SDS によって 6i-helical 構造をとった分子鎖を exowise に切断結合して α -CD を生成すると考えられる。アミロースとマセランス酵素の反応で、反応開始時に SDS を添加すると、無添加に比較して生成総 CD 量は多く α -CD が主生成物となり、しかも無添加ではヨウ素反応を示さない程度のデキストリンとなるが、添加では青色となり、長鎖のデキストリンの存在を示した²²⁾。いわゆる endo 型の加水分解作用は SDS によって抑制されていると考えられる。もし分子鎖が 6i-helical 構造をとってスキームの SS $\rightarrow\beta$, MD $\rightarrow\beta$ をブロックすると仮定すれば、7i-helical 構造をとらせれば逆に SS $\rightarrow\alpha$ の経路がブロックされて β -CD が主生成物になるはずである。そこで SDS の代りに Triton X-100 を添加してみると、やはり β -CD が主生成物となった²³⁾。同様にして 7 以上の CD も、8i-helical 以上の構造をとらせる試薬がわかればその生成量が多くなると考えられる。複合体形成試薬によって cyclization 反応はある程度コントロールされ、 α , β -CD の選択的生成は可能となった。

V. 枝付 CD (stuffed CD) の生成とその機作

複合体形成試薬は G₈ 以上の直鎖を巻いて CD 生成に有利な構造をとらせ、生成量を増大させるが、アミロペクチンなど分岐の多い基質では巻けない部分が多いので、CD 生成量は少ないと思われる。しかし、実際はア

ミロースと同程度の生成量となり、アミロペクチンからの CD の生成量は SDS により 80% 以上になる。したがって cyclization 反応は分岐を飛び越して進むか、または endo 型の hydrolysis $\rightarrow$ cyclization のように進むと考えられる。endo 型の hydrolysis 反応が最初であるとすれば、分岐デキストリンまたはオリゴ糖が生成されるであろう。そして非還元末端から少なくとも 7 グルコース以上の部分をもつ分岐糖からは、cyclization 反応により CD を生成すると考えられる。最終的にはマセランス酵素の限界デキストリンを残すようである。SDS を添加した場合、限界デキストリンの量が激減し、 α -CD と各種の枝の付いた α -CD を生成する。SDS によって分岐オリゴ糖も helical 構造をとり、マセランス酵素の作用を受けやすくなると考えられる。枝付 CD の存在はペーパークロマトグラフィーで認められ、グルコアミラーゼとプルラーナーゼの分解作用で構造は明確にされた。

以上の知見、考察から分岐の多い基質、例えばグリコーゲン、 β -アミラーゼの限界デキストリンに複合体形成試薬とともにマセランス酵素を作用させれば、枝付 CD は高収率で得られるであろう。

VI. ま と め

マセランス酵素は従来三つの作用を持つといわれていたが、酵素の精製技術の進歩とともに、単一酵素の複数作用であることが確認されてきた。しかし酵素は本来特異性を持つものであるから、複数作用の間に何らかの共通性が存在するのであろう。分子内または分子間転移が容易となるように基質の構造を変化させて、見かけ上酵素の特異性を変化させ得るが、作用個所の周辺では基質はいつも同じ構造をとっているものと考えられる。マセランス酵素にはもう一つの加水分解様作用がある。この作用が CD 生成に関与していることは、複合体形成試薬の添加実験により明らかであるが、どのくらいの重合度で切るかなど反応のパターンは明らかでない。

以上、マセランス酵素の作用機作から、 α , β -CD の選択的生成は可能となり、さらに多グルコース環 CD 生成の可能性も示された。枝付 CD の調製も容易になった。これらの新しい基質を用い、アミラーゼ作用の情報を集め、より詳細な作用機作の研究とその利用を考えて行きたい。

食糧研究所入所以来、本研究を遂行するに当たり、終始ご指導、ご鞭撻をいただきました食品総合研究所食品理

化学部 鈴木繁男部長, 炭水化物研究室 貝沼圭二室長, 有益なご助言とご討論をいただきました東京大学農学部 中村道德教授, 東京農工大学農学部 小林恒夫教授に感謝いたします。最後に, 研究に協力された食品総合研究所の諸氏に感謝いたします。

文 献

- 1) D. FRENCH: *Advan. Carbohydr. Chem.*, **12**, 189 (1957).
- 2) J. A. THOMA AND L. STEWART: in "Starch, Chemistry and Technology," R. L. Whistler and E. F. Paschall, eds., Academic Press Inc., New York, N. Y., (1965).
- 3) beta-Cyclodextrin: Corn Products Development, A Division of Corn Products Company (1968).
- 4) W. I. CONGDON AND M. L. BENDER: *Bioorg. Chem.*, **1**, 424 (1971).
- 5) 岡田茂孝, 北畑寿美雄: アミラーゼシンポジウム, **8**, 21 (1973).
- 6) 竹尾健一: 京都府立大学学術報告, 農学, **23** 号, p. 168 (1971).
- 7) 小林昭一, 貝沼圭二, 鈴木繁男: 澱粉科学, **21**, 131 (1974).
- 8) K. KAINUMA AND D. FRENCH: *FEBS Letter*, **5**, 257 (1969).
- 9) 小林昭一, 貝沼圭二, 鈴木繁男: 澱工誌, **18**, 10 (1971).
- 10) 貝沼圭二, 野上明子, 佐野春樹, 鈴木繁男: 日本澱粉学会大会講演要旨集, p. 29 (1974).
- 11) O. HOLMBERG: *Biochem. Z.*, **258**, 134 (1933).
- 12) 岡田茂孝, 津山直人, 北畑寿美雄: アミラーゼシンポジウム, **7**, 61 (1972).
- 13) 河野啓一, 二国二郎: 澱工誌, **9**, 23 (1961).
- 14) 小林昭一, 貝沼圭二, 鈴木繁男: 生化学 (大会抄録号), **46** (8), 499 (1974).
- 15) 小林昭一, 貝沼圭二, 鈴木繁男: 澱粉科学, **22**, 7 (1975).
- 16) 久下 喬, 竹尾健一: 澱粉科学, **21**, 151 (1974).
- 17) J. A. THOMA AND D. E. KOSHLAND, Jr.: *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 3329 (1960).
- 18) 塩坂 誠, 文屋秀雄: アミラーゼシンポジウム, **8**, 43 (1973).
- 19) 掘越弘毅: 同上, **8**, 37 (1973).
- 20) 小林昭一, 貝沼圭二, 鈴木繁男: 日本澱粉学会大会講演要旨集, p. 11 (1975).
- 21) K. SAKON, T. WATANABE AND S. ONO: *Bull. Chem. Soc. Japan*, **43**, 1000 (1970).
- 22) 小林昭一, 貝沼圭二, 鈴木繁男: アミラーゼシンポジウム, **8**, 29 (1973).
- 23) 小林昭一, 貝沼圭二, 鈴木繁男: 日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 332 (1975).