シクロデキストリン合成酵素の糖転移作用

北 畑 寿美雄*・岡 田 茂 孝*

Intermolecular Transglycosylation of Cyclodextrin Glycosyltransferase

Sumio KITAHATA and Shigetaka OKADA

Osaka Municipal Technical Research Institute
(2-1-1, Ogimachi, Kita-ku, Osaka 530, Japan)

The acceptor specificity in the intermolecular transglycosylation of cyclodextrin glycosyltransferase (CGT-ase) was investigated using 18 kinds of monosaccharides and their derivatives. It is concluded on the basis of the experimental results that the requirement for an acceptor of the intermolecular transfer reaction catalyzed by CGT-ase is the pyranose structure having the same configurations of the C2-, C3- and C4-hydroxyl group as D-glucopyranose. Furthermore, it was showed that CGT-ase transferred the glycosyl residues only to C3-hydroxyl group of L-sorbose as acceptor and C4-hydroxyl group of D-glucose, D-xylose and 2-deoxy-D-glucose as acceptor. On the other hand, in the case of D-galactose as acceptor which is different from D-glucopyranose in the configuration of the hydroxyl group at C4 position, CGT-ase transferred the glycosyl residues to C1-, C3- and C2-(C4-) hydroxyl group of D-galactose in the proportion of 26 : 10 : 1.

cyclodextrin glycosyltransferase (以下 CGT-ase と略) は、澱粉単独に作用させると分子内転移作用により cyclodextrin を生成するがグルコースやスクロースのような受容体存在下に澱粉に作用させると分子間転移作用により、澱粉より直接受容体にグリコシル基を転移させる作用を併せもつ酵素である。

CGT-ase としては古くより *Bacillus macerans* の生産する酵素がよく知られていたが¹⁾、研究は本酵素による生成物である cyclodextrin の化学構造および物性に向けられ、酵素の精製や作用様式についての研究は比較的近年まで放置されていた^{2,3)}。

数年前より、著者らは CGT-ase の分子間転移作用を食品加工および有用配糖体の合成等に応用することを目的として、強力に分子間転移作用を触媒する CGT-ase 生産菌の検索を行ってきた。その結果、有望菌株として *B. megaterium* No. 5 株を得、この菌株の生産する酵素を高度に精製し、その酵素的性質および酵素作用について検討した⁴⁻⁷⁾。この酵素は、澱粉に作用させると *B. macerans* の酵素(主として cyclohexaamylose を生成)

の場合とは異なり、主として cycloheptaamylose を生成する点で作用特異性を異にしている。

本報告では、CGT-ase を澱粉と糖質の混合系に作用させ、分子間転移作用を行わせるときの受容体になりうるための糖質の構造上の条件およびこれら受容体への転移位置について検討した。

実験材料および方法

1. 使用酵素標品および糖質

B. megaterium および *B. macerans* の生産する CGT-ase はいずれも当研究室で超遠心的、電気泳動的に単一にまで精製した酵素標品を使用した⁵⁾。gluco-amyase は当研究所で調製した結晶標品を用いた。β-amyase は、福本・辻阪の方法⁸⁾により脱脂大豆から精製し、α-amyase、α-glucosidase を含まない標品を用いた。

6-デオキシ-D-グルコース、3-O-メチル-D-グルコースはペンシルバニア州立大学 J. H. Pazur 教授より、コージビオース、ニゲロース、1-O-, 4-O-α-D-グルコシル-L-ソルボースは北海道大学 千葉誠哉博士より、ラミナリビオースは大阪市立大学 江幡淳子博士より、ま

* 大阪市立工業研究所(530 大阪市北区扇町 2-1-1)

たキンロビオースは当研究所 竹西繁行博士より恵与されたものを使用した。その他の糖試料はすべて和光純薬工業製のものを使用した。

2. ペーパークロマトグラフィー

東洋濾紙 No. 50 (40×40 cm) を使用し、展開溶媒として *n*-ブタノール：ピリジン：水 (6：4：3 v/v) を用い上昇法により4回展開した。還元糖の検出にはアルカリ性硝酸銀による浸漬法を用いた⁹⁾。

3. 濾紙電気泳動

東洋濾紙 No. 51 に 3 cm 間隔で試料をつけ、泳動用溶媒として 0.1M モリブデン酸ナトリウム (pH 5.0) または 0.05M ホウ酸緩衝液 (pH 9.8) を用いて 20~25 volts/cm の電圧で2時間泳動した。

4. オリゴ糖の比旋光度の測定

オリゴ糖の比旋光度は、日本分光 (株) 製自動旋光計 (DIP-SL 型) を用い、糖濃度 1%, 20℃ において測定した。

5. グルコース、ガラクトースの分別定量

グルコース量は、グルコース・オキシダーゼを用いて定量し、ガラクトース量はフェノール・硫酸法¹⁰⁾により全糖量を測定し、全糖値よりグルコース量を差引いて計算した。

6. 転移生成物の構造の分析

オリゴ糖の重合度は Timmel の方法¹¹⁾ により測定した。四酢酸鉛酸化は Perlin と鈴木の方法¹²⁻¹⁵⁾ にしたがって実施した。オリゴ糖の完全メチル化は Hakomori の方法¹⁶⁾ を一部かえた Saito らの方法¹⁷⁾ により実施した。メチル化単糖の分析はアルジトール・アセテートの形に変換してガスクロマトグラフィーにより分析した。ガスクロマトグラフィーの条件は次のとおりである。

カラム：ECNSS-M on Gas Chrom. Q, 2m

カラム温度：180℃, N₂ ガス流量：30 ml/min

実験結果ならびに考察

1. 受容体特異性

1954年, French らは *B. macerans* の酵素を用い cyclohexaamylose を糖供与体とした場合の受容体特異性について検討し、有効な受容体になりうるのは D-グルコースか、またはその C1 位置換体のみであると報告している¹⁸⁾。われわれは *B. megaterium* の CGT-ase を新たに得たので、本酵素の受容体特異性を *B. macerans* の酵素と比較検討し、CGT-ase の受容体になりうるための糖の条件について調べた。

種々の糖質 (30 μmoles) を含む 5% 澱粉溶液 400 μl に

Table 1. The acceptor specificity of cyclodextrin glycosyltransferase from *B. megaterium* and *B. macerans*.

Group		<i>B. megaterium</i> enzyme		<i>B. macerans</i> enzyme	
		starch degradation ^{a)}	transfer products ^{b)}	starch degradation ^{a)}	transfer products ^{b)}
A	L-sorbose	27	###	7.0	###
	D-glucose	9.9	###	7.0	###
	6-deoxy-D-glucose	2.8	##	1.8	##
	D-xylose	2.2	##	1.6	##
B	2-deoxy-D-glucose	1.3	+	1.2	+
	3-O-methyl-D-glucose	1.2	+	1.2	+
C	D-glucuronic acid	1.0	—	1.0	—
	D-galactose	1.0	±	1.0	±
	L-arabinose	1.1	—	1.0	—
	D-ribose	1.1	—	1.0	—
	D-fructose ^{c)}	1.0	—	1.0	—

^{a)} Relative rates of starch degradation in the presence of acceptor to that in its absence.

^{b)} Intensities of the spots of transfer products on paper chromatogram (###, very strong; ##, strong; +, weak; —, negative).

^{c)} The following sugars and sugar alcohols gave completely negative results in both tests, like D-fructose; D-mannose, D-glucosamine, N-acetyl-D-glucosamine, L-rhamnose, sorbitol, xylitol and glycerol.

Fig. 1. Transfer products to various acceptors by CGT-ase.

R: maltooligosaccharides, 1: control (starch only), 2, 3 and 4: transfer products to D-glucose, L-sorbose and D-xylose, 5 and 6: 2-deoxy-D-glucose and transfer products to that sugar, 7 and 8: 3-O-methyl-D-glucose and transfer products to that sugar, 9 and 10: 6-deoxy-D-glucose and transfer products to that sugar.

B. megaterium および *B. macerans* の酵素 (8 u/ml, 100 μ l) を加え, 40°C にて反応させ, 1 時間後に 100 μ l をとりヨウ素呈色により澱粉の分解速度を測定した. また 24 時間反応後の生成物をペーパークロマトグラフィーにより分離し転移生成物の存在の有無を確認した. 計 18 種類の糖質について検討した結果を Table 1, Fig. 1 に示した. Table 1, Fig. 1 より明らかなように, 澱粉分解速度が促進された L-ソルボース, D-グルコース, 6-デオキシ-D-グルコース, D-キシロース, 2-デオキシ-D-グルコース, 3-O-メチル-D-グルコースはいずれもペーパークロマトグラフィーにより転移生成物が確認された. また Table 1 より明らかなように, いずれの受容体に対しても *B. megaterium* の酵素は *B. macerans* の酵素に比べて速い転移速度を示した.

今回調べた単糖類は転移生成物の量からみて三つのグループに大別することができる. すなわち, 転移生成物の最も多いグループ A (D-グルコース, L-ソルボース, D-キシロース, 6-デオキシ-D-グルコース), 転移生成物の比較的少ないグループ B (2-デオキシ-D-グルコース, 3-O-メチル-D-グルコース), 転移生成物をほとんど合成しないグループ C (D-ガラクトース, D-マンノース, D-リボース等) の三つである. それぞれのグループに属する糖のうち代表的なものについて, 水溶液中で存在している主要な構造を Fig. 2 に示した.

Fig. 2. The chief conformation of various monosaccharides occupied in the water solution.

Fig. 2 より明らかなようにグループ A に属している糖はいずれもピラノース環を形成していること, さらにはグループ A に属しているグルコース, キシロース, ソルボースを還元し環状構造を破壊して糖アルコールにする受容体になりえないことより, 受容体になりうるためにはまず糖はピラノース環を形成していることが必要であると考えられる. またグループ A に属している糖はいずれも C2-, C3-, C4-OH を有しており, C2-OH が H に置換された 2-デオキシ-D-グルコース, C3-OH が -OCH₃ に置換された 3-O-メチル-D-グルコースは受容体になりうるが, その効率は低いことより C2-, C3-OH は欠くことができないと思われる. 最後に C2-, C3-, C4-OH のコンフィギュレーションに関しては, グループ A に属している糖はいずれも D-グルコースと同じく equatorial であり, D-グルコースとはそれぞれ C4-OH または C2-OH のコンフィギュレーションのみ異なった D-ガラクトース, D-マンノースが受容体になりえないこと, および D-キシロースとは C3-OH のコンフィギュレーションのみ異なった D-リボースが受容体になりえないことより受容体になりうるためには, C2-, C3-, C4-OH のコンフィギュレーションは D-グルコースと同じく equatorial であることが必要であると考えられる.

以上の結果より, 著者らは CGT-ase の糖転移作用において有効な受容体になりうるためには, 糖は少なくともピラノース環を形成し, その C2-, C3-, C4-OH は欠くことができず, しかもそれら C-OH のコンフィギュレーションは D-グルコースと同じくすべて equatorial であることが必要であると推測している.

2. L-ソルボース, D-キシロースへの転移生成物の構造

L-ソルボース, D-キシロースへの転移生成物のうち最も *Rf* 値の大きい糖区分 (それぞれ GS, GX と略称) の構造を調べた。

1) 構成糖, 還元性末端および重合度の測定

GS および GX を塩酸により酸加水分解し, 構成糖を調べたところ Fig. 3, 4 に示したように GS はグルコースとソルボースとから成っていること, GX はグルコー

Fig. 3. Paper electrophoresis of acid hydrolyzates of the oligosaccharides GS and reduced GS.

Electrophoresis was carried out in 0.1 M sodium molybdate solution (pH 5.0) at 20 V/cm for 90 min.

1: glucose, 2: sorbose, 3: GS, 4: acid hydrolyzate of GS, 5: reduced GS, 6: acid hydrolyzate of reduced GS, 7: reduced sorbose.

Fig. 4. Paper chromatogram of acid hydrolyzates of the oligosaccharides GX and reduced GX.

R: reference maltooligosaccharides, 1: GX, 2: acid hydrolyzate of GX, 3: reduced GX, 4: acid hydrolyzate of reduced GX, 5: reference sugars (xylose, glucose).

スとキシロースとから成っていることがわかった。次に還元性末端を調べるため NaBH_4 により還元後酸加水分解したところ, GS の場合にはグルコースのスポットは検出されたがソルボースのスポットは消失していること, また GX の場合にはグルコースは検出されたが, キシロースは消失していることより GS および GX の還元性末端はそれぞれソルボース, およびキシロースであることがわかった。次に Timmel の方法により重合度を測定した結果, GS, GX いずれも 2.0 であった。以上の結果より, GS は還元性末端にソルボースを含むグルコシル-ソルボースであり, GX はグルコシル-キシロースであると判定した。

2) 四酢酸鉛酸化による結合位置の決定

GS は還元力を有することより五つの結合様式 (1,1-, 1,3-, 1,4-, 1,5-, 1,6-結合) が考えられる。GS の結合様式を決める手段として還元性末端側の糖区分の隣接する水酸基を優先的に酸化分解する四酢酸鉛酸化の方法を使用した。標準物質として 6-O-ガラクトシル-D-グルコース, 1-O-, 4-O-グルコシル-L-ソルボース, 3-O-グルコシル-D-フラクトースを用いた (Fig. 5)。Fig. 5 より明らかに GS は標準物質の 3-O-グルコシル-D-フラクトースと同じく四酢酸鉛酸化を受けなかったことより, GS は 1,3-結合の 3-O-グルコシル-L-ソルボースであると判定した。

キシロースはピラノース構造をとること, および GX

Fig. 5. Rates of lead tetraacetate consumption for oligosaccharide GS and related sugars.

Fig. 6. Rates of lead tetraacetate consumption for oligosaccharide GX and related sugars.

は還元力を有することより, GX の結合様式は 1,2-, 1,3- あるいは 1,4-結合のいずれかであると考えられる. この場合にも四酢酸鉛酸化の方法により結合様式を調べた. 標準物質としてキシロビオース(1,4-結合), ラミナリビオース(1,3-結合), コーシビオース(1,2-結合)を用いた(Fig. 6). その結果, 四酢酸鉛酸化により GX は糖 1 モル当りキシロビオースと同じく四酢酸鉛 1.8 モル消費したことより, GX は 1,4-結合の 4-O-グルコシル-D-キシロースであると判定した.

3) 比旋光度測定

GS の比旋光度を測定し種々結合様式の D-グルコシル- α -L-ソルボースのその文献値と比較した. その結果, GS の比旋光度は $+70.1^\circ$ で 3-O- α -D-グルコシル-L-ソルボースの文献値 $+69.1^\circ$ とよく一致した. また GX の比旋光度を測定し, 種々結合様式の D-グルコシル- α -D-キシロースのその文献値と比較した. その結果, GX は比旋光度 $+93.0^\circ$ で 4-O- α -D-グルコシル-D-キシロースの文献値 $+95.0^\circ$ とよく一致した.

4) 高重合度の転移生成物の構造

L-ソルボース, および D-キシロースへの転移生成物にそれぞれ glucoamylase, β -amylase を作用させて分解生成物をペーパークロマトグラフィーにより検討した. L-ソルボースへの転移生成物は glucoamylase 消化により GS とグルコースを生成し, β -amylase 消化によりマルトースを生成した. またキシロースへの転移生成物は glucoamylase 消化により, GX とグルコースを生成し, β -amylase 消化によりマルトースを生成した. このことより, ソルボース, キシロースへの転移生成物は Fig. 7 に示す模式により行われていると考えられる.

なお, 今回は紙面の都合上省略したが, D-グルコー

Fig. 7. Formation of transglycosylation products with L-sorbitose and D-xylose by CGT-ase.

G: glucose, S: sorbitose, X: xylose, —: glycosidic linkage.

ス, デオキシ-D-グルコースを受容体に用いた場合にも CGT-ase はいずれも C4-OH にのみ選択的に転移することが明らかになっている^{19,20}.

3. D-ガラクトースへの転移生成物の構造

D-ガラクトースは CGT-ase の糖転移作用における受容体に非常になりにくい糖で転移生成物の量は, D-グルコースを受容体に用いた場合の約 2% である. D-ガラクトースはグルコースを受容体に用いた場合の転移位置である C4-OH のコンフィギュレーションが D-グルコースとは逆になっており, その意味で D-ガラクトースへの転移位置は非常に興味を持たれたので検討した.

1) 転移生成物の調製

D-ガラクトース (7g) と澱粉 (7g) を含む水溶液 80 ml に *B. megaterium* の酵素 (50 u/ml, 20ml) を加え, 40 $^\circ\text{C}$, 24 時間反応させた. 転移生成物のうち重合度の最も小さいオリゴ糖を収率よく得るため, 反応液に対して

Fig. 8. Paper chromatogram (Fig. 8-a) and paper electrophoresis (Fig. 8-b) of transfer products from soluble starch to D-galactose.

1: transfer products to D-galactose (oligosaccharide B), 2: transfer products to D-galactose (oligosaccharide A), 3: glucose, 4: galactose.

glucoamylase 消化を行った後、活性炭カラム、ペーパークロマトグラフィーにより転移生成物を調製した。ペーパークロマトグラフィーにより移動度の異なる2種のオリゴ糖A(収量 36mg) およびオリゴ糖B(92mg) が得られた(Fig. 8-a)。しかし、ホウ酸緩衝液を用いる濾紙電気泳動によりオリゴ糖 A, B の純度を調べたところ Fig. 8-b に示したように、オリゴ糖Aは3成分(A-a, A-b, A-c)に分れた。一方、オリゴ糖Bは2成分(B-a, B-b)に分れた。オリゴ糖Aはそのまま、オリゴ糖Bは濾紙電気泳動により B-a, B-b を分離精製後それぞれの構造を調べた。

2) オリゴ糖Aの構成糖、還元性末端および重合度の測定

オリゴ糖Aを塩酸により酸加水分解し構成糖を調べたところ、オリゴ糖Aはグルコースとガラクトースとから成っていることがわかった。また NaBH_4 により還元し還元性末端を調べたところガラクトースであること、Timmel の方法により重合度を測定した結果 2.0 であること、さらに濾紙電気泳動により3成分より成っていることが判明した。以上のことから、オリゴ糖Aは結合位置の異なる3種のグルコシル-ガラクトースの混合物であると推測された。

3) 完全メチル化の方法によるオリゴ糖Aの構造分析

オリゴ糖Aを実験方法に記載した方法によりメチル化分析した。オリゴ糖Aを完全メチル化後、酸加水分解して得られたメチル化単糖のアリトール・アセテートのガスクロマトグラフィーの結果を Table 2 に示す。オリゴ糖Aの非還元性末端に由来する 2,3,4,6-テトラ-O-メチル-D-グルコースと還元性末端に由来する 2,4,6-2,3,6- および 3,4,6-トリ-O-メチル-D-ガラクトースのピークが検出され、それらの面積比よりオリゴ糖Aの90% 強が 3-O-グルコシル-D-ガラクトースであり、残り 10% 弱が 4-O- と 2-O-グルコシル-D-ガラクトースの混合物であると推定される。

4) オリゴ糖Bの構造

オリゴ糖 B-a, B-b の構成糖、還元性末端、重合度お

よびグルコースとガラクトースの組成比をそれぞれ実験方法に記載した方法に準じて調べた。その結果、オリゴ糖 B-a は構成糖としてはグルコースのみであること、重合度は 2.0 であること、さらにペーパークロマトグラフィーの R_f 値より B-a はイソマルトースであることがわかった。このイソマルトースは CGT-ase の転移作用により合成されたものではなく、転移生成物調製の際に用いた glucoamylase の作用によりグルコースから逆合成されたものであると考えられる。一方、オリゴ糖 B-b は構成糖としてグルコースとガラクトースそれぞれ 1 分子ずつより成り、還元力を有しないことより O- α -D-グルコシル-D-ガラクトースであると判定した。

以上、CGT-ase の D-グルコース、L-ソルボース、D-キシロース、2-デオキシ-D-グルコースおよび D-ガラクトースなどの単糖類への転移位置を検討した。その結果、D-グルコース、L-ソルボース、D-キシロース、2-デオキシ-D-グルコースを受容体にした場合には、CGT-ase はそれぞれ C4-OH, C3-OH, C4-OH, C4-OH と D-グルコースの C4-OH に相当する位置にのみ選択的に転移することがわかった。しかし、C4-OH のコンフィギュレーションが D-グルコースとは逆になっている D-ガラクトースを受容体に用いた場合には (D-ガラクトースへの転移量は非常に少なく D-グルコースの場合の約 2%) グリコシル基は主として D-ガラクトースの C3-OH および C1-OH に、また一部は C2-, C4-OH に転移し転移位置に選択性は認められなかった。

本研究を行うにあたりご討論、ご助言いただいた当研究所所長 辻阪好夫博士、大阪大学産業科学研究所教授 福井俊郎博士に深謝いたします。

また糖の構造決定に際して、完全メチル化の方法をご指導いただいた大阪市立大学教授 三崎旭博士ならびに貴重な試料を分与いただいたペンシルバニア州立大学教授 J. H. Pazur 博士、北海道大学助教授 千葉誠哉博士、大阪市立大学 江幡淳子博士、当研究所 竹西繁行博士に感謝いたします。

文 献

- 1) E. B. TILDEN and C. S. HUDSON: *J. Am. Chem. Soc.*, **63**, 2900(1939).
- 2) J. A. DEPINTO and L. L. CAMPBELL: *Biochemistry*, **7**, 114(1968).
- 3) J. A. DEPINTO and L. L. CAMPBELL: *Arch. Biochem. Biophys.*, **125**, 253(1968).
- 4) 岡田茂孝, 津山直人, 北畑寿美雄: アミラーゼシン

Table 2. Results of gas liquid chromatogram of the alditol acetates of methylated oligosaccharide A.

Methylated monosaccharide	Molar ratio
2,3,4,6-tetra-O-methyl-glucose	1.0
2,4,6-tri-O-methyl-galactose	0.9
2,3,6-tri- or 3,4,6-tri-O-methyl-galactose	0.07

- ボジウム, 7, 61(1972).
- 5) S. KITAHATA, N. TSUYAMA and S. OKADA: *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 387(1974).
 - 6) S. KITAHATA and S. OKADA: *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 2413(1974).
 - 7) S. KITAHATA and S. OKADA: *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 2185(1975).
 - 8) 福本寿一郎, 辻阪好夫: 科学と工業, **28**, 282(1954).
 - 9) W. E. TREVELYAN, D. P. PROCTER and J. S. HARRISON: *Nature*, **166**, 444(1950).
 - 10) M. DUBOIS, K. A. GILLS, J. K. HAMILTON, P. A. REBERS and F. SMITH: *Anal. Chem.*, **28**, 350(1956).
 - 11) T. E. TIMMEL: *Svensk Papperstid.*, **63**, 668(1960).
 - 12) A. S. PERLIN: *Anal. Chem.*, **27**, 396(1955).
 - 13) A. S. PERLIN: *Adv. Carbohydr. Chem.*, **14**, 9(1959).
 - 14) S. SUZUKI: *Bull. Tokyo Inst. Technol.*, **52**, 1(1963).
 - 15) 鈴木周一: 化学の領域, **17**, 449(1963).
 - 16) S. HAKOMORI: *J. Biochem.*, **55**, 205(1964).
 - 17) S. SAITO, A. MISAKI and T. HARADA: *Agric. Biol. Chem.*, **34**, 1683(1970).
 - 18) D. FRENCH, M. L. LEVINE, E. NORBERG, P. NORDIN, J. H. PAZUR and G. M. WILD: *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 2387(1954).
 - 19) S. KITAHATA and S. OKADA: *J. Biochem.*, **79**, 641(1976).
 - 20) S. KITAHATA, S. OKADA and T. FUKUI: *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 2369(1978).

【質問】

東大農化 中村

- 1) この酵素の donor specificity について, マルトース, マルトトリオース等も donor になるか.
- 2) マルトースまたはマルトトリオースから転移が起これるとすると, この酵素は glucosyltransferase であると考えられるか.
- 3) この酵素の転移反応でグルコシル基, マルトシル基, マルトトリオシル基等が転移されるとすると, この酵素は非常に基質特異性あるいは反応特異性が広いと考えてよいか.
- 4) この反応は, 澱粉あるいは他の donor からいったん cyclodextrin を経て cyclodextrin の開環, 転移, 生成物間の disproportionation によると考えることはできないか. また, もしこの disproportionation が起これているとすると, D-enzyme との差はどうか.

【答】

- 1) donor になります. α -1,4-グルカンであれば 2 量体以上の糖はすべて donor になります.

2) この酵素は glycosyltransferase であり, donor の種類により異なるがグルコース何個単位でも転移すると考えている. しかし, アミロース, 澱粉のような高分子基質を donor に用いると, 反応の初期はグルコース 6 個または 7 個単位の転移が主としておこり, つぎにいったん生成した転移生成物間の disproportionation が非常にすみやかに起こるために, 見かけ上グルコース 1 個, 2 個, 3 個単位の転移が起こったように見えるものと考えている.

3) この酵素の反応特異性は非常に広く, 澱粉単独に作用させると分子内転移反応により cyclodextrin を生成し, 受容体が存在すると分子間転移反応を示し, また disproportionation も触媒します. さらに, この酵素は微弱ですが加水分解作用をも触媒します.

4) この酵素を受容体存在下, 澱粉に作用させた場合に生成される転移生成物はすべて cyclodextrin を経て生成したものではなく, 少なくとも一部は澱粉より直接受容体に転移したものであると考えております. CGT-ase と D-enzyme との相違は, CGT-ase が cyclodextrin を生成するという点のみが異なり, その他の作用はほとんど同じではないかと考えている.

【質問】

食品総研 小林

- 1) *Bacillus megaterium* の酵素は少糖類を生成するようであるが, 加水分解作用は持っているか.
- 2) cyclodextrin の水への転移速度 (加水分解速度) はグルコースへの転移速度と比較してどの位ですか.
- 3) 澱粉分子が直接受容体の糖に coupling するとのお考えを以前に明らかにされたが現在でもそのようにお考えでしょうか. 私どもは, coupling 反応は cyclodextrin を通って起これると考えておりますが….

【答】

- 1) *B. megaterium* の酵素も *B. macerans* の酵素と同じく微弱ではあるが加水分解作用を持っております.
- 2) 正確には定量しておりません. 受容体が存在しない時には, cyclodextrin は非常に分解されにくいということはいえます.
- 3) 現在でもそのように考えております. その根拠として次の 2 点があげられます.

①受容体への転移速度を比較すると, 澱粉を donor に用いた場合の方が cyclodextrin を donor に用いた場合よりも速い.

②転移生成物の分布を比較すると, 澱粉を donor に用いた場合, マルトオクタオース以上の転移生成物の比率が大きい.

いずれも間接的な証明方法でありますので現在、直接的な証明方法を検討しております。

【質問】 Howard Hughes Med. Inst.

J. John Marshall

I would like to ask whether anything is known about the sweetness characteristics of glucosyl-sorbose and glucosyl-xylose. Also, is it known whether these disaccharides can be hydrolyzed by the α -glucosidases in the small intestine.

【答】

The sweetness of glucosyl-sorbose and glucosyl-xylose is less than that of sorbose and xylose, respectively. The sweetness characteristics of these disaccharides are not determined.

These disaccharides can probably be hydrolyzed by the α -glucosidases in the small intestine.

【質問】

食品総研 小林

グルコシルスクロースを結晶化されていますがどの位の収率でしょうか。その収率を上げるための factor については検討されていますか。たとえば、基質濃度を高めるとか、pH を変化させるとか。これらの factor から生成メカニズムを明らかにする試みが必要かと思われませんが。

【答】

グルコシルスクロースは結晶化しておりません。グルコシルスクロースの収率は donor と受容体の濃度により変動いたしますが、たとえば、20% 濃度の馬鈴薯澱粉（液化率 14.5%）と 20% 濃度のショ糖から合成した場合には 17.4% であります。現在のところ、この収率を上げるための factor については検討しておりません。