[J. Appl. Glycosci. (応用糖質科学), Vol. 46, No. 2, p. 207-215 (1999)]

糖質関連酵素化学シンポジウム

CGTase のアミロース環状化反応*

寺田喜信**, 三瓶春代¹, 鷹羽武史, 岡田茂孝, 北畑寿美雄², 小泉京子¹

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)

¹ 武庫川女子大学薬学部 (663-8179 西宮市甲子園九番町 11-68)

² 大阪市立工業研究所 (536-0025 大阪市城東区森之宮 1-6-50)

Cyclization Reaction of CGTase on Amylose*

Yoshinobu Terada,** Haruyo Sanbe,¹ Takeshi Takaha, Shigetaka Okada,
Sumio Kitahata² and Kyoko Koizumi¹

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

¹ School of Pharmaceutical Sciences, Mukogawa Women's University
(11-68 Koshien Kyuban-cho, Nishinomiya 663-8179, Japan)

² Osaka Municipal Technical Research Institute (1-6-50 Morinomiya, Jyoto,
Osaka 536-0025, Japan)

The cyclization reaction of cyclodextrin glucanotransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) from alkalophilic *Bacillus* sp. A2-5a, *Bacillus macerans*, and *Bacillus stearothermophilus* on amylose was reinvestigated by the use of high-performance anion exchange chromatography. When CGTase from alkalophilic *Bacillus* sp. A2-5a (A2-5a CGTase) was incubated with synthetic amylose, cyclic α -1,4-glucans with degree of polymerization (DP) from 6 to more than 60 were produced in the initial stage of the reaction. The molecular mass and the cyclic structure of these glucans were determined by TOF-MS and ¹³C NMR. The larger cyclic α -1,4-glucans produced in the initial stage of the reaction of A2-5a CGTase were subsequently converted into smaller cyclic α -1,4-glucans and into the final major product, β -CD. CGTase from *B. macerans* (*B. macerans* CGTase) also produced larger cyclic α -1,4-glucans, which were then converted into smaller cyclic α -1,4-glucans and into the final major product α -CD. *B. macerans* CGTase, however, converted larger cyclic α -1,4-glucans into smaller ones more slowly than A2-5a CGTase did. On the other hand, most of the α -1,4-glucans produced by the action of *B. stearothermophilus* CGTase were α -, β -, and γ -CD, and only a few larger cyclic α -1,4-glucans were detected. From these results, a new model of the cyclization reaction of CGTase was proposed.

シクロデキストリン合成酵素 (CGTase) は澱粉などの α -1,4-グルカンに作用して分子内転移反応を触媒し、環状の α -1,4-グルカンであるシクロデキストリン (CD) を合成する酵素である。CGTase により合成される CD の重合度は主として 6-8 であり、それぞれ α -, β -, γ -CD (以後 CD 類と略) と呼ばれている。CD 類はさまざまな物質と包接体を形成し、包接した

物質の溶解性や安定性を向上させる性質をもつことから、産業的にも広く利用されている。そのため CD 類を合成する酵素である CGTase について数多くの研究がなされており、現在までに *Bacillus* 属菌をはじめとする 30 種を超える細菌にその存在が報告されている。

近年まで α -1,4-グルカンの環状化反応を行う酵素は CGTase しか知られていなかった。しかし、1996 年に馬鈴薯の D-酵素が α -1,4-グルカンの環状化反応を触媒し、重合度 17 から数百にまで及ぶ環状 α -1,4-

* "Proceedings of the Symposium on Amylases and Related Enzymes, 1998."

** Corresponding author.

グルカン (シクロアミロース) を合成することが報告された¹⁾。その後、馬鈴薯の D-酵素とよく似た反応を触媒する *Escherichia coli*²⁾ や *Thermus aquaticus*³⁾ の amylomaltase (EC 2.4.1.25) でも同様の反応が行われること、さらにアミノ酸の 1 次配列的には馬鈴薯の D-酵素とほとんど相同性のない *Thermococcus litoralis*⁴⁾ や *Pyrococcus* sp. KOD1⁵⁾ の 4- α -glucanotransferase (EC 2.4.1.25) でもよく似た環状化反応が行われることがわかってきた。また、*Bacillus subtilis* の α -amylase (EC 3.2.1.1) でも少量ながら環状の α -1,4-グルカン合成できることが報告されている⁶⁾。その他、*B. stearothermophilus* の branching enzyme (EC 2.4.1.18) が α -1,4-グルカンに作用し α -1,6 結合を環状構造内に含んだ環状グルカンを作ることも報告された⁷⁾。これらの事実から、 α -1,4-グルカンの環状化反応は α -1,4-グルカンの転移反応を触媒し得る酵素に共通した性質である可能性が高まってきた。

馬鈴薯 D-酵素をアミロースに作用させ、生成したシクロアミロースを経時的に分析すると、反応の初期には比較的重合度の大きいシクロアミロースが作られる。その後反応が進むにしたがってシクロアミロースの重合度が小さくなり、最終的に重合度 17-50 程度の平衡状態に達する¹⁾。このことから CGTase も反応の初期に CD 類より重合度の大きい環状 α -1,4-グルカン合成していると考えた。これを確かめるために CGTase の反応について再検討した。

CGTase がシクロアミロースを作ることの証明

CGTase としては最初に、当研究室において土壌より分離された好アルカリ性 *Bacillus* sp. A2-5a 由来の CGTase (A2-5a CGTase) を用いた^{8,9)}。また、CGTase は澱粉などの α -1,6 結合を含んだグルカンに作用すると α -1,6 結合を含んだ CD 類を合成するので、反応生成物の解析を容易にするために、基質として酵素合成アミロースを使用した。馬鈴薯の D-酵素を酵素合成アミロースに作用させたときの反応生成物の経時変化を考慮すると、CGTase が CD 類よりも重合度の大きい環状 α -1,4-グルカン合成するとすれば、それは反応の比較的初期の段階であることが推測された。そこで、A2-5a CGTase を酵素合成アミロースに反応させ、CD 類の収量が 5% 以下の段階で反応を停止した。この反応液中の直鎖 α -1,4-グルカンを経時的にグルコアミラーゼによりグルコースにまで分解し、残った環状 α -1,4-グルカンを高性能陰イオン交換クロマトグラフィー (HPAEC) により分析した (Fig. 1A)。

Fig. 1. HPAEC analysis of glucoamylase-resistant molecules produced by the action of CGTase from alkalophilic *Bacillus* sp. A2-5a (A) and cycloamyloses produced by the action of potato D-enzyme (B).

HPAEC was carried out based on the DX-300 system (Dionex) with a pulsed electrochemical detector (model PED-2, Dionex), using a Carbowpak PA-100 column (4 $\times$ 250 mm, Dionex).⁹⁾ (A) Synthetic amylose with an average molecular mass of 30 kDa (0.2% (w/v), amylose AS-30), which was dissolved in 1 N NaOH and neutralized by adding 1 N HCl and 1 M sodium acetate buffer (pH 5.5), was incubated with 140 U/mL of CGTase from alkalophilic *Bacillus* sp. A2-5a and 0.25 M sodium acetate (pH 5.5) at 40°C for 10 min, and the reaction was terminated by boiling the solution for 5 min. The reaction mixture was incubated with 18 U/mL of glucoamylase at 40°C for 16 h, then boiled for 5 min. The reaction mixture (25 μ L) was analyzed by HPAEC. (B) Cycloamyloses were synthesized by potato D-enzyme from amylose AS-30.

すると予想どおり従来の CD 類以外にも多くのピークが検出された。このクロマトグラムを馬鈴薯 D-酵素で合成したシクロアミロース (Fig. 1B) のものと比較したところ溶出位置がほぼ一致したことから A2-5a CGTase でもシクロアミロースが合成されていることが示唆された。これら CGTase により合成されたグルコアミラーゼ耐性グルカンが環状 α -1,4-グルカンであることを確かめるために、これらの分子の分子量を TOF-MS により測定した (Table 1)。環状構造を仮

Table 1. TOF-MS analysis of glucoamylase-resistant molecules.

DP	Experimental [M+Na] ⁺	Theoretical*	
		Cyclic	Linear
6	995	996	1014
7	1157	1158	1176
8	1329	1320	1338
9	1483	1482	1500
10	1643	1644	1662
11	1807	1807	1825
12	1969	1969	1987
13	2131	2131	2149
14	2292	2293	2311
15	2456	2455	2473
16	2617	2617	2635
17	2778	2779	2797
18	2942	2942	2960
19	3104	3104	3122
20	3267	3266	3284

* Theoretical masses of linear and cyclic glucans were calculated as $162.1436n + 22.9898 + 18.01534$ Da and $162.1436n + 22.9898$ Da, respectively, in which n is DP, 162.1436 Da is the mass of glucosyl residue, 22.9898 Da is the mass of sodium ion, and 18.01534 Da is the mass of H₂O.

定した場合、その分子量は同じ重合度の直鎖のグルカンよりも水1分子分小さくなる。そのため、各分子の分子量の測定値を計算値と比較することによって環状構造を有するかどうかを判断することができる。このTOF-MSにより得られた分子量を計算値と比較したところ、環状構造を仮定した場合の値とよく一致していた。また、これらの分子は *Bacillus subtilis* 由来の α -amylase により glucose と maltose にまで完全に分解され、 α -1,6 結合を分解する isoamylase や pululanase の作用をまったく受けなかったことから、これらが環状 α -1,4-グルカンであることが確認された。以上の結果から CGTase においても CD 類より重合度の大きい環状 α -1,4-グルカンを合成しうることが確かめられた。

CGTase 反応生成物の経時変化

CGTase はこれまで30種を超える細菌により生産されることが報告されている。通常これらの CGTase は最も多量に合成する CD の種類により分類されている。 α -CD を多く作る CGTase には *Bacillus macerans*¹⁰⁾, *Klebsiella oxytoca*¹¹⁾ 由来のものなどが、 β -CD を多く作る CGTase には *Bacillus circulans*¹⁰⁾, *Bacillus megaterium*¹⁰⁾, 好アルカリ性 *Bacillus*^{8,12-14)}, *Thermo-*

*anaerobacter*¹⁵⁾ 由来のものなどが、 γ -CD を多く作る CGTase には *Brevibacterium*¹⁶⁾, 好アルカリ性 *Bacillus*¹⁷⁾ 由来のものなどがある。また、*Bacillus stearothermophilus*¹⁰⁾ 由来の CGTase は α -と β -CD をほぼ同じ程度合成する。この分類にしたがうと、先に述べた A2-5a CGTase は β -CD を多く作るタイプに属する。A2-5a CGTase が CD 類よりも重合度の大きい環状 α -1,4-グルカンを合成することが明らかとなったことから、次にその他の CGTase の反応についても興味をもたれた。そこで、 β -CD を多く作る A2-5a CGTase に加え、 α -CD を多く作る *B. macerans* 由来の CGTase (*B. macerans* CGTase) と、 α -と β -CD をほぼ同量作る *B. stearothermophilus* 由来の CGTase (*B. stearothermophilus* CGTase) についてアミロースへの作用を再検討した。各 CGTase の酵素量は平均重合度 30 kDa の酵素合成アミロース 0.05% (w/v) 溶液を基質とし、40℃ で反応させたときのヨウ素呈色の低下速度が等しくなるようにそろえた。

平均分子量 30 kDa の酵素合成アミロース 0.2% (w/v) 溶液に各 CGTase を 40℃ で作用させ経時的に反応を停止後、glucoamylase により直鎖のグルカンをグルコースにまで分解し、残った環状 α -1,4-グルカンを HPAEC で分析した (Fig. 2)。その結果、*B. macerans* CGTase は A2-5a CGTase (Fig. 2A) と同様に反応初期に CD 類よりも重合度の大きい環状 α -1,4-グルカンを合成していた (Fig. 2B)。これら反応初期に合成された重合度 50 以上 (分析時間短縮のため保持時間 80 分以降にまとめて溶出させているピーク) の環状 α -1,4-グルカンは、反応が進むにしたがってさらに CGTase の作用を受け、CD 類を含めた比較的重合度の小さいものへと変換された (Fig. 2A, B)。そして最後に、ほとんどの環状 α -1,4-グルカンが CD 類になるという反応経過を示した。最終的に合成される CD 類は A2-5a CGTase では β -CD が、*B. macerans* CGTase では α -CD が最も多かった。それに対し、*B. stearothermophilus* CGTase (Fig. 2C) では反応初期においても CD 類より重合度の大きい環状 α -1,4-グルカンがほとんど検出されず、他の2種の CGTase と異なる結果が得られた。

これら3種の CGTase によって合成された環状 α -1,4-グルカンを定量的に分析した結果を Fig. 3 に示した。グルコアミラーゼ処理後の反応液中のグルコース量を全糖量から引くことにより全環状 α -1,4-グルカン量を求め、その全環状 α -1,4-グルカン量から HPAEC により定量した CD 類の量²³⁾ を引くことに

Fig. 2. HPAEC analysis of cyclic α -1,4-glucans produced by the action of CGTases.

HPAEC was carried out based on the BioLC 4000i system (Dionex) with a pulsed amperometric detector (model PAD-II, Dionex), using a Carbpak PA-100 column (4×250 mm, Dionex).²³⁾ Amylose was dissolved in 90% (v/v) dimethyl sulfoxide. Before use, the dimethyl sulfoxide in the solution was removed by a gel-filtration chromatography, using a PD-10 column (Pharmacia) at 80°C. Amylose AS-30 (0.2% [w/v]) thus obtained was incubated at 40°C with 85 U/mL of CGTases from alkalophilic *Bacillus* sp. A2-5a (A), *B. macerans* (B) and *B. stearothermophilus* (C). After the reaction was terminated by boiling the solution for 10 min, the reaction mixture was incubated with 27 U/mL of glucoamylase at 40°C for 16 h, then boiled for 5 min. The reaction mixture (25 mL) was analyzed by HPAEC. Numbers above the peaks indicate DPs of cyclic α -1,4-glucans. G5 indicates maltopentaose used as an internal standard. The activity of CGTase was assayed by using amylose AS-30 as the substrate, measuring the decrease in iodine-staining power. One unit of the enzyme was defined as the amount of the enzyme that produces a 1% reduction of A_{660} per min.

より重合度 9 以上の環状 α -1,4-グルカン量を求めた。今回の反応条件において、A2-5a (Fig. 3A) や *B. macerans* (Fig. 3B) CGTase では反応 1 時間程度で全アミロースの約 70% が環状 α -1,4-グルカンに変化した。しかし、この段階で CD 類は 10-20% 程度の収量でしかなかった。結果として、反応 1 時間で全アミロースの 50% 以上が重合度 9 以上の環状 α -1,4-グルカンに変化していたことになる。その後、全環状 α -1,4-グルカン量は収量約 80% で増加しなくなったが、環状 α -1,4-グルカンの重合度分布は変化し続け、CD 類を含めてより重合度の小さいものの割合が増加し、最終的に環状 α -1,4-グルカンの大部分が CD 類になった。ところが反応 23 時間の段階において、A2-5a

CGTase の合成した環状 α -1,4-グルカンは大部分が CD 類に変化していたのに対し、*B. macerans* CGTase では CD 類以外の環状 α -1,4-グルカンが収量で約 40% も残っていた。このことはこの両者において一度合成した環状 α -1,4-グルカンにさらに作用してより重合度の小さい環状 α -1,4-グルカンに変換する活性に差のあることを示している。一方、*B. stearothermophilus* CGTase (Fig. 3C) では合成される環状グルカンの大部分が CD 類であった。

CGTase の反応モデル

以上の結果から、これら 3 種の CGTase の環状化反応についてわれわれが考えるモデルを Fig. 4 にまと

Fig. 3. Time course of the amount of cyclic α -1,4-glucans produced by the action of CGTases.

The amount of glucose in reaction mixtures of CGTases from alkalophilic *Bacillus* sp. A2-5a (A), *B. macerans* (B), and *B. stearothermophilus* (C), prepared as described in the legend to Fig. 2, was measured by the glucose oxidase method. The amount of total cyclic α -1,4-glucans (○) was calculated by subtracting the amount of glucose released by glucoamylase from that of total glucan in the reaction mixture. The amount of CDs (α -, β - and γ -CD; □) was determined by HPAEC.²³⁾ The amount of cyclic α -1,4-glucans with DP > 9 (●) was calculated by subtracting the amount of CDs from that of total cyclic α -1,4-glucans.

めた。今回調べた3種のCGTaseは大きく分けて二つのタイプに分けることができる。一つは好アルカリ性 *Bacillus* A2-5aや *B. macerans* 由来のCGTaseのよ

Fig. 4. Models of cyclization reaction of CGTases on amylose.

Solid lines and circles indicate α -1,4-glucan chains, where relative lengths represent their relative DP. CD, α -, β -, and γ -CD; Ø, glucosyl residue with reducing end; A, α -1,4 linkage attacked by CGTases, where the relative sizes of arrows represent the relative frequencies of the attack of CGTases. "A2-5a," "B. mac.," and "B. ste." indicate the reaction pathway of CGTase from alkalophilic *Bacillus* sp. A2-5a, *B. macerans*, and *B. stearothermophilus*, respectively.

うに、反応初期にCD類より重合度の大きい環状 α -1,4-グルカンを合成するものである。もう一つは *B. stearothermophilus* 由来のCGTaseのように、反応初期より主としてCD類のみを合成するものである。これまでCGTaseの環状化反応については、生成物としてCD類が主として検出されていた。そのため、CGTaseは α -1,4-グルカンの非還元末端から6-8個目のグルコース残基を順に認識するエキソ型の酵素であると考えられていた。しかし、A2-5aや *B. macerans* CGTaseがCD類より重合度の大きい環状 α -1,4-グルカンを合成できたことは、これらのCGTaseが環状化反応において非還元末端から6-8番目以降の α -1,4結合に広く作用していることを示している。それに対し、*B. stearothermophilus* CGTaseはFig. 2C, 3Cの結果より、非還元末端から6-8番目の α -1,4結合にかなり特異的に作用しているようにみえる。しかし、*B. stearothermophilus* CGTaseでも少量ながらCD類よりも重合度の大きい環状 α -1,4-グルカンを合成しており、またここにはデータを示していないが、基質濃度や酵素量などの条件を変えて反応させることにより重合度50程度の環状 α -1,4-グルカンが合成されることも確認している。そのため、*B. stearo*-

thermophilus CGTase の反応も他の 2 者と基本的に同じであるが、非還元末端から 6-8 番目以外の α -1,4 結合に作用したときに環状化反応をしにくい（この場合は不均化反応や加水分解が起こっているものと考えられる）タイプの酵素であると考えられる。この点については今後更なる検討が必要であると思われる。

一方、A2-5a と *B. macerans* CGTase は反応初期によく似た生成物を合成したが、その後の反応経過に差がみられた。A2-5a CGTase では反応の経過とともに CD 類以外の環状 α -1,4-グルカンが速やかに CD 類にまで変換されたのに対し、*B. macerans* CGTase では反応 23 時間後でも CD 類以外の環状 α -1,4-グルカンが残っていた。環状 α -1,4-グルカンへさらに作用して、より重合度の小さい環状 α -1,4-グルカンを合成するためには、環状構造をいったん開く必要がある。そこで馬鈴薯 D-酵素により合成したシクロアミロースに各 CGTase を作用させたときの反応液中の還元力の上昇を測定することにより、環状 α -1,4-グルカンに対する加水分解活性を見積もった。その結果、*B. macerans* CGTase の加水分解活性が反応液 1 mL 当り 0.39×10^{-3} U（1 分間に $1 \mu\text{mol}$ のグルコースに相当する還元力を生成する酵素量を 1 U と定義）であったのに対し、A2-5a CGTase では 2.3×10^{-3} U であり、*B. macerans* CGTase の 5.9 倍の加水分解活性を示した（ちなみに、*B. stearothermophilus* CGTase は 4.9×10^{-3} U で、*B. macerans* CGTase の 12.6 倍）。この環状 α -1,4-グルカンの加水分解活性が、環状 α -1,4-グルカンの重合度を小さくする活性に関与していると考えられる。しかし、この結果のみではまだ不十分であるため、今後さらに検討したい。

CGTase のアミロース環状化反応の分析より、今回 Fig. 4 の反応モデルを示した。しかし、このモデルは CGTase の環状化反応の説明しかできていない。CGTase は環状化反応以外にも、加水分解反応や不均化反応なども同時に触媒している。そのため、実際の CGTase の反応はより複雑な状態で進行しているものと推定される。このような複雑な状態で進行する反応をどのように捕らえていくかが今後の課題の一つと考えている。

おわりに

これまでアミロースの環状化反応は CGTase のみが触媒する特殊な反応であり、この反応では重合度が 6 から 8 の CD 類が特異的に生産されると信じられて

きた。しかしながら、馬鈴薯 D-酵素やその他のグルカン転移酵素が同様の環状化反応を触媒し、重合度が数十、数百という環状 α -1,4-グルカンを生産しうることが明らかとなるにつれ、私たちは CGTase の反応についても疑念を抱くようになった。今回の実験結果は、CGTase の環状化反応がこれまで一般的に考えられていた反応とはかなり異なるものであることを示している。馬鈴薯の D-酵素あるいは amylomaltase

Fig. 5. Schematic representation of cyclic α -1,4-glucans in top (left) and side (right) views.

For clarity, only O2, O3 (black), and C6 (gray) atoms are drawn. CDn represents a cyclic α -1,4-glucan with DP of n.

と CGTase の反応には多くの共通性がみられるが、大きな相違点も存在している。その中で私たちが最も興味を抱いている点は、生産される環状 α -1,4-グルカンの最小重合度の違いである。多くの CGTase では生産される環状 α -1,4-グルカンの最小重合度は 6 であるが、馬鈴薯 D-酵素では 17¹⁾ であり、*Thermus aquaticus* 由来の amylomaltase では 22³⁾ である。このような最小重合度を決定するメカニズムを解明し、さらに環状化反応を理解するためには、これらグルカン転移酵素の立体構造と、環状 α -1,4-グルカンの立体構造がともに明らかにされる必要があると考えられる。これまで重合度 6 から 9 の環状 α -1,4-グルカンの構造はすでに明らかにされていた^{18,19)}。近年これらに加えて、重合度 10, 14, 26 の環状 α -1,4-グルカンの構造も解明された²⁰⁻²²⁾。これらの構造を簡略化して Fig. 5 に示したが、重合度 10 以上の環状 α -1,4-グルカンには、それより重合度の小さい CD 類などにみられなかった 2 個所の Flip 構造 (グルコシド結合が 180° 反転した構造) がみつかるなど非常に興味深い知見が得られている。私たちはすでに重合度 31 までの環状 α -1,4-グルカンの単離にも成功しており²³⁾、これらの構造解析が今後さらに進展するものと期待される。一方、CGTase 以外のグルカン転移酵素の構造解明に向けて、私たちは現在 *Thermus aquaticus* 由来の amylomaltase の結晶構造解析も行っている。これら酵素とグルカンの構造解析結果を利用して、CGTase をはじめとするグルカン転移酵素の環状化反応を解明していきたい。

文 献

- 1) T. Takaha, M. Yanase, H. Takata, S. Okada and S. M. Smith : *J. Biol. Chem.*, **271**, 2902-2908 (1996).
- 2) 柳瀬美千代, 鷹羽武史, 高田洋樹, 岡田茂孝 : 農芸化学会誌 (講演要旨), **70**, 295 (1996).
- 3) Y. Terada, K. Fujii, T. Takaha and S. Okada : *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 910-915 (1999).
- 4) B.-S. Jeon, H. Taguchi, H. Sakai, T. Ohshima, T. Wakagi and H. Matsuzawa : *Eur. J. Biochem.*, **248**, 171-178 (1997).
- 5) Y. Tachibana, S. Fujiwara, M. Takagi and T. Imanaka : *J. Ferment. Bioeng.*, **83**, 540-548 (1997).
- 6) T. Nishimura, T. Kometani, T. Nakae, H. Takii and S. Okada : *J. Ferment. Bioeng.*, **81**, 26-31 (1996).
- 7) H. Takata, T. Takaha, S. Okada, M. Takagi and T. Imanaka : *J. Bacteriol.*, **178**, 1600-1606 (1996).
- 8) T. Kometani, Y. Terada, T. Nishimura, H. Takii and S. Okada : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 517-520 (1994).
- 9) Y. Terada, M. Yanase, H. Takata, T. Takaha and S. Okada : *J. Biol. Chem.*, **272**, 15729-15733 (1997).
- 10) S. Kitahata, S. Okada : *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **29**, 13-18 (1982).
- 11) H. Bender : *Arch. Microbiol.*, **111**, 271-282 (1977).
- 12) N. Nakamura and K. Horikoshi : *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 935-941 (1976).
- 13) K. Kimura, S. Kataoka, Y. Ishii, T. Takano and K. Yamane : *J. Bacteriol.*, **169**, 4399-4402 (1987).
- 14) 八木佳明, 佐藤充克, 石倉知之 : 澱粉科学, **33**, 144-151 (1986).
- 15) B. E. Norman and S. T. Jørgensen : 澱粉科学, **39**, 101-108 (1992).
- 16) S. Mori, S. Hirose, T. Oya and S. Kitahata : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 1968-1972 (1994).
- 17) Y. Fujita, H. Tsubouchi, Y. Inagi, K. Tomita, A. Ozaki and K. Nakanishi : *J. Ferment. Bioeng.*, **70**, 150-154 (1990).
- 18) W. Saenger, J. Jacob, K. Gessler, T. Steiner, D. Hofmann, H. Sanbe, K. Koizumi, S. M. Smith and T. Takaha : *Chem. Rev.*, **98**, 1787-1802 (1998).
- 19) T. Fujiwara, N. Tanaka and S. Kobayashi : *Chem. Lett.*, 739-742 (1990).
- 20) H. Ueda, T. Endo, H. Nagase, S. Kobayashi and T. Nagai : *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.*, **25**, 17-20 (1996).
- 21) J. Jacob, K. Geßler, D. Hoffmann, H. Sanbe, K. Koizumi, S. M. Smith, T. Takaha and W. Saenger : *Angew. Chem. Int. Ed.*, **37**, 605-609 (1998).
- 22) K. Geßler, I. Uson, T. Takaha, N. Krauß, S. M. Smith, S. Okada, G. M. Sheldrick and W. Saenger : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 4246-4251 (1999).
- 23) 三瓶春代 : 武庫川女子大学大学院薬学研究科薬学専攻学位論文 (博士前期課程) (1998).

【質 問】

檜作

1) 反応初期に高重合度環状 α -1,4-グルカンができていますが、酵素の大きさから考えてそのような大きい分子を認識しているとは考えられない。どのようにしてそのような高重合度環状 α -1,4-グルカンが合成されるのですか？

2) 基質のアミロースをアルカリで溶解した場合と DMSO で溶解した場合、あるいは反応液にブタノールを加えた場合で反応生成物に差がみられませんか？

3) 環状 α -1,4-グルカンの結晶構造はアミロースの水溶液中での構造を理解するのに有力な武器になるのではないのでしょうか？

【答】

1) 今回検出されたような高重合度の環状 α -1,4-グルカンを CGTase の酵素分子がすべて認識することは物理的に難しいという点は、おっしゃるとおりだと思います。そのため、このような高重合度環状 α -1,4-グルカンの合成を説明するためには、基質である

アミロースの水溶液中での構造を考える必要があると考えております。Fig. 5から環状 α -1,4-グルカンの結晶にFlip構造が存在することが明らかとなりましたが、このような構造は水溶液中のアミロースの構造においても存在すると想像しております。こういう構造を仮定した場合、高重合度の環状 α -1,4-グルカン合成したときにCGTaseが作用した α -1,4結合と非還元末端とは3次構造的に近い位置に存在することが可能となります。CGTaseによる高重合度の環状 α -1,4-グルカンの合成はそのような3次構造的に近い位置に存在している α -1,4結合と非還元末端グルコース残基との間で転移反応が起こることによって合成されるのではないかと考えております。

2) Fig. 1の結果はアミロースをアルカリで溶解後中和して反応させたもので、Fig. 2の結果はアミロースを90% DMSOに溶解後ゲル濾過によりDMSOを除いて反応させたものです。この両者で反応生成物にほとんど差はみられませんでした。反応液中にブタノールなどを加えたときの生成物の変化については今後の課題であります。

3) おっしゃるとおりだと思います。1)でも述べましたように、高重合度の環状 α -1,4-グルカンの構造は、水溶液中でのアミロースの構造を一部反映している可能性があると考えております。今後これら環状 α -1,4-グルカンの構造が、水溶液中でのアミロースや澱粉などのグルカンの構造を解明する手がかりになるのではないかと期待しております。また、アミロースは水に溶解しにくいですが、これが環状化されると水への溶解度が飛躍的に高まります。この理由が構造解析の結果から説明できるとすれば、大変興味深いことであると思っております。

【質 問】 筑波大 山根

高重合度環状 α -1,4-グルカンに対するCGTaseの作用機作を教えてください。

【答】

一度合成された高重合度環状 α -1,4-グルカンは、CGTaseの作用をさらに受けて、CD類を含めより重合度の小さい環状 α -1,4-グルカンに変換されます。この反応を行うためには環状 α -1,4-グルカンの環状構造をいったん開く必要がありますが、これはCGTaseの加水分解反応やカップリング反応によって起こります。また、詳細は現在検討中なのですが、環状 α -1,4-グルカンの重合度別の生成量をモル濃度で定量しましたところ、可能な限り反応の初期をみても、

α -、 β -CDの生成量が他の環状 α -1,4-グルカンよりも多い(10-20倍)という結果も得つつあります。このような性質と、環状化反応の基質である直鎖グルカンの重合度がCGTaseの作用によって低下する(つまり、高重合度環状 α -1,4-グルカンの合成ができなくなる)こととあわせて、環状 α -1,4-グルカンの重合度低下とCDの蓄積が起こると考えています。

【質 問】 生研機構 貝沼

CGTaseと基質との親和性を考えるときに、環状グルカンと直鎖グルカンとの間に差がありますか？

【答】

上にも述べましたようにCGTaseは高重合度環状 α -1,4-グルカンのすべてを認識できないと思われます。そのため、酵素が反応する部分だけに注目しますと、直鎖グルカンと高重合度の環状グルカンはほぼ同じ構造をしていると考えられますので、親和性自体は大きく変わらないのではないかと考えております。最終的な反応生成物も基質としてアミロースを使用した場合とシクロアミロース(馬鈴薯D-酵素により合成)を使用した場合とで大きな差はみられませんでした。ただ、ほぼ同じ重合度の直鎖グルカンと環状グルカンにCGTaseを作用させた場合には、非還元末端の有無により反応速度に差があるものと予想されますがこの点は今後の検討課題であります。

【質 問】 東農工大 坂野

1) CGTaseは常に非還元末端側から作用して環状化反応をするのですか？

2) 非還元性末端側から作用するとき、生成するのは必ず環状化合物ですか？直鎖状のものは生成しないのですか？

【答】

1) オリゴ糖への作用機作から、CGTaseは直鎖のグルカンの非還元末端から順にエキソ型で作用すると考えられてきました。しかし今回、より長い直鎖状グルカンに作用させたところ高重合度の環状 α -1,4-グルカンが同時に生成していましたので、CGTaseの反応には、エンド型の作用機構も考えた方がより説明しやすいのではないかと考えております。エンド型で作用しても環状化反応が起こるのは、CGTaseが作用した α -1,4結合と非還元末端が3次構造的に最初から近い位置に存在しており、その非還元末端への転移反応が起こったためであると考えております。

2) CGTaseはグルカンの環状化反応(分子内転移

反応)の他に、分子間転移反応である不均化反応も触媒しますので、その不均化反応に伴う新たな直鎖状グルカンも同時に合成されていると考えられます。しかし、今回の実験方法では不均化反応に由来する生成物を区別することができません。そのため、現在のデータだけで CGTase の作用機作のすべてを説明できて

いないと思っております。アミロースを基質としたときの不均化反応の検出方法の検討も、CGTase の反応を論じる上で今後の課題であると考えております。

(平成 11 年 2 月 3 日受付)