[*J. Appl. Glycosci.*, Vol. 48, No. 2, p. 153-161 (2001)]

糖質関連酵素化学シンポジウム

トレハロース生成酵素 MTSase の構造と機能解析

久保田倫夫*, 丸田和彦, 福田恵温, 栗本雅司, 辻阪好夫, 小林正則¹, 松浦良樹¹

株式会社林原生物化学研究所 天瀬研究所 (700-0834 岡山市天瀬南町 7-7)

¹ 大阪大学蛋白質研究所 (565-0871 吹田市山田丘 3-2)

Structure and Function Analysis of Malto-oligosyltrehalose Synthase

Michio Kubota,* Kazuhiko Maruta, Shigeharu Fukuda,
Masashi Kurimoto, Yoshio Tsujisaka, Masanori Kobayashi¹ and Yoshiki Matsuura¹

Amase Institute, Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc.
(7-7, Amase Minami-machi, Okayama 700-0834, Japan)

¹*Protein Institute, Osaka University*
(3-2, Yamadagaoka, Suita 565-0871, Japan)

Malto-oligosyltrehalose synthase (EC 5.4.99.15, MTSase) is a glycosyltransferase catalyzing the conversion of maltodextrins to malto-oligosyltrehaloses by forming α, α -1,1-glucosidic linkage. The enzyme slightly catalyzes the release of glucose from maltodextrins by hydrolysis of the α -1,4 linkage of maltodextrins on the reducing end. The amino acid sequence of MTSase from *Sulfolobus acidocaldarius* ATCC 33909 showed significant homologies to those of not only other bacterial MTSases but also α -amylase family enzymes. The *S. acidocaldarius* MTSase lost the enzyme activity by site-directed mutation of Asp228, Glu255, or Asp443 of the enzyme, which corresponded to the catalytic residues of α -amylase family enzymes. The mutation of Lys390 or Lys445 brought about a decrease of the transfer activity and an increase of the hydrolysis activity of the enzyme. The two lysine residues are conserved among MTSases but not α -amylase family enzymes. The tertiary structure analysis revealed that MTSase as well as α -amylase family enzymes contained a (β/α)₈ barrel structure as the catalytic domain. The three carboxyl residues (Asp228, Glu255 and Asp443) proposed as the catalytic center of MTSase were found to be located in the active cleft and positioned similarly to those of α -amylase family enzymes. There were two loops and one helix structures on one end of the active cleft, where a nearly closed space was formed. The lysine residues (Lys390 and Lys445) were found to be situated in the closed structure. It was suggested that several residues containing the two lysines in the closed structure were involved in catalysis of the α, α -1,1 transfer activity of MTSase.

トレハロース(α, α -trehalose)は、2分子のグルコースが α, α -1,1結合した非還元性の二糖で、微生物から動植物まで広く存在している。従来、トレハロース合成に関わる酵素系として、トレハロース-6-リン酸シンターゼ(EC 2.4.1.15)とトレハロースホスファターゼ(EC 3.1.3.12)によるトレハロース-6-リン酸を経由する反応が知られていた¹⁾。最近になって、従来の

酵素とは異なったリン酸非依存型の新規トレハロース生成酵素(系)が2種類発見された。一つは、グルコース重合度が3以上の α -1,4グルカンを経質とするMTSase (Malto-oligosyltrehalose synthase, EC 5.4.99.15)²⁾とMTHase (Malto-oligosyltrehalose trehalohydrolase, EC 3.4.1.141)³⁾とからなる酵素系で、もう一つは、マルトースを直接トレハロースに変換するトレハロースシンターゼ (Maltose α -D-glucosyltransferase, EC 5.4.99.16)⁴⁾である。これらのうち、MTSase/MTHase

* Corresponding author.

酵素系は澱粉からトレハロースを高率に生成するため、トレハロースの工業製造に実用化されている⁵⁾。

MTSase と MTHase の両酵素は、土壌から分離された *Arthrobacter* sp. Q 36 が生産する菌体内酵素として初めて見出された⁶⁾。その後、*Arthrobacter ramosus*⁷⁾を含め多くの *Arthrobacter* 属細菌が両酵素を生産すること⁸⁾や、*Sulfolobus* 属^{9,10)}など他の細菌種にもその存在が報告された。いくつかの菌株から遺伝子 DNA がクローニングされ¹¹⁻¹³⁾、DNA にコードされる酵素蛋白一次配列が明らかにされているだけでなく、両酵素遺伝子は一つのオペロンを形成してトレハロース生成に働いていると推定されている。

MTSase は α -1,4 グルコシド結合の α , α -1,1 結合への変換を触媒するユニークな転移酵素と考えられており、その反応機構については興味深いところが多い。本稿では、MTSase の転移活性に焦点を当て、酵素構造と機能との相関について最近の知見をいくつか紹介する。

MTSase 作用

MTSase は、アミロースなど α -1,4 グルカンの還元末端グルコースの α -1,4 結合を切断し分子内で α , α -1,1 転移してアミロシルトレハロースを生成する分子内糖転移を主に触媒する転移酵素である (Fig. 1)。この転移反応は可逆的であり、アミロシルトレハロースをアミロースに変換するが、反応の平衡は α , α -1,1 転移側 (アミロシルトレハロース生成側) に傾いている。この酵素は分子内転移だけでなく、水分子への転移で

ある水解作用や高濃度グルコース存在下での分子間転移をわずかに触媒する¹⁴⁾ことも知られている。グルコース重合度が3以上の α -1,4 グルカンが基質として利用されるが、重合度が2のマルトースには作用しないと考えられている。 α -1,4 グルカンの還元末端にフラクトースが結合した基質の α 1- β 2 結合にも作用し分子内転移や水解を触媒することも報告されている¹⁵⁾。

このような MTSase の作用について、特徴的な二つの性質をあげることができる。

- 1) α -1,4 グルカンの還元末端側に exo 型で作用する。
- 2) 切断した還元末端グルコースの1位水酸基 (α -アノマー) に転移する。

この二つの特徴的な作用を、本酵素の構造の観点から探索してみようというのが本稿の意図するものである。

一次構造解析

これまで報告されている7種起源の MTSase アミノ酸一次配列を Fig. 2 に示す。いくつかの挿入や欠失が存在するが、いずれも約 700-800 残基から構成されている。配列を比較すると、よく保存されている領域が散在している。保存領域のうち、第 90 残基 (*S. acidocaldarius* MTSase の残基番号) 付近、第 230 残基付近、第 250-260 残基付近、第 440 残基付近の四つの領域は、 α -アミラーゼや CGTase などの α -アミラーゼファミリー酵素間で保存されている配列 (A-, B-, B'-,

Fig. 1. MTSase reaction.

Fig. 2. Amino acid sequence comparison among MTSases from 7 bacterial origins.

SA, from *S. acidocaldarius*;¹²⁾ SS, from *S. solfataricus*;²⁶⁾ AR, *Arthrobacter* sp.;¹¹⁾ AR, *A. ramosus*; BH, *Brevibacterium helovolum*;²⁷⁾ RS, *Rhizobium* sp.;¹³⁾ MT, *Mycobacterium tuberculosis*.²⁸⁾ The marked (†) residues were mutated in this study (see text). The asterisk means the residue identical to that of *S. acidocaldarius* MTSase.

Enzyme	Conserved Regions			
	A	B	B'	C
MTSase	DIVPNH	GYRIDH	IIVEKI	ATSTHD
α -Amylase	DVVYNH	GLRLDA	CIGEAV	FVRNHD
G4-Amylase	DVVPNH	GFRFDA	CVGELW	FVDNHD
CGTase	DFAPNH	GIRFDA	TFGEWF	FIDNHD
Maltase	DLVINH	GFRIDT	RVGEVA	YIENHD
Pullulanase	DVVYNH	GFRFDL	FFGEGW	YVSKHD
Isoamylase	DVVYNH	GFRFDL	LFAEPW	FIDVHD
Branching enzyme	DWVPGH	GFRVDA	MIAEDS	LPFSHD

Fig. 3. The conserved regions among MTSase and the α -amylase family enzyme.

MTSase from *S. acidocaldarius*;¹²⁾ α -amylase from *Aspergillus oryzae*;²⁹⁾ G4-Amylase from *Pseudomonas stutzeri*;³⁰⁾ CGTase from *Bacillus stearothermophilus*;³¹⁾ maltase from *Saccharomyces carlsbergensis*;³²⁾ pullulanase from *Klebsiella aerogenes*;³³⁾ isoamylase from *Flavobacterium* sp.;³⁴⁾ branching enzyme from *B. stearothermophilus*.³⁵⁾

C-region)¹⁶⁾と類似していた (Fig. 3). また, 第 50 残基付近の HGVD や第 600 残基付近の DPDNR の配列も α -アミラーゼや CGTase によく保存されているものであった. これらの領域のアミノ酸残基は, 既に立体構造が決定されている α -アミラーゼファミリー酵素では活性クレフトを構成していることがわかっている¹⁷⁻²⁰⁾. これらの一次配列の情報は, MTSase が α -アミラーゼファミリー酵素と類似した活性クレフトを有し, MTSase 転移機構の一部分は α -アミラーゼ作用と共通していることを示唆するものであった.

部位特異的変異

部位特異的変異解析は, 酵素蛋白の構造と機能との相関を研究する上において有力な手法である. 著者らは, *S. acidocaldarius* の MTSase 遺伝子を用いて部位特異的変異解析を行った²¹⁾. *S. acidocaldarius* の遺伝子は大腸菌で高発現化されており²²⁾, その酵素は耐熱性が高い (85°C) ため, 組換え酵素の調製や取扱いが容易であった. また, 遺伝子 DNA への変異も市販のキット (Takara 社製) を用いて高頻度で得ることができた.

1. 触媒残基

α -アミラーゼファミリー酵素の触媒残基は, 保存領域 B, B', C の中の三つの酸性残基であると提唱されている²³⁾. MTSase 配列中にも, これら酸性残基 (Asp228, Glu255, Asp443) は保存されており, 本酵素においても触媒基として働いている可能性が考えら

れた. そこで, それぞれの残基の変異体 Asp228Asn, Glu255Gln, Asp443Asn を作製し, 組換え大腸菌の高発現系で蛋白生産させ, ゲル電気泳動法 (native PAGE, SDS-PAGE) で抽出液中の変異酵素蛋白の存在を確認した後, 抽出液中の酵素活性を測定したところ, いずれの変異体においても本酵素活性は検出されなかった. この結果は, Asp228, Glu255, Asp443 が MTSase の触媒残基であることを強く支持するものであり, α -アミラーゼの触媒残基と類似した働き (おそらく, α -1,4 結合の切断と水酸基への転移) に関与している可能性を示唆した.

2. 転移に関与する残基

MTSase の配列には, α -アミラーゼファミリー酵素と類似したもの以外に, MTSase 間のみで保存されている配列が存在する. そのような配列の中には MTSase の特異的な α , α -1,1 転移に関与する残基が含まれている可能性があると考え, Table 1 に示す 12 個のアミノ酸残基について部位特異的変異解析を行った. 遺伝子 DNA に変異を導入した後, 大腸菌の中で高発現化して変異酵素蛋白を生産させた. 変異酵素を含む抽出液を熱処理 (60°C) して宿主大腸菌の挟雑活性を失活させた後, 基質マルトペンタオースを用いて転移活性 (還元力の低下) と水解活性 (グルコースの遊離) を測定した. その結果, 1) Arg192, Asp275, Tyr400, Arg402 の変異は両活性への影響は少ない, 2) Asp231, Lys256, Tyr274 の変異は両活性を大幅に減少させる, 3) His229, Glu393 の変異は両活性を消

Table 1. Transglycosylation and hydrolysis activities of the mutated MTSases.

Mutation	Transglycosylation ^a (%)	Hydrolysis ^a (%)
Arg192Ala	40.1	1.1
His229Asn	<0.4	<0.04
Asp231Ala	7.9	0.51
Lys256Thr	3.5	0.39
Tyr274Ser	2.6	0.27
Asp275Ala	43.2	1.0
Lys390Thr	16.0	4.7
Glu393Ala	<0.4	<0.04
Asp394Ala	1.7	1.1
Tyr400Ser	80.8	1.5
Arg402Ser	71.2	1.3
Lys445Thr	3.9	2.7
Wild-type	100	2.0

^a Maltopentaose (1%) was incubated with the enzyme at 60°C, pH 6.0 for 1 h. The decrease of the reducing power was measured by the Somogyi-Nelson method for the transglycosylation activity. The release of glucose was assayed by the glucose oxidase method for the hydrolysis activity.

失させる, 4) Lys390, Asp394, Lys445 の変異は転移活性を減少させるが, 水解活性の減少は少ない, もしくは逆に増加させることがわかった.

Lys390, Lys445 を種々のアミノ酸に置換したところ, Table 2 に示すように, 両 Lys とも大きな側鎖を有する Trp への置換によって転移活性のみが大幅に減

少し, 見かけの転移活性は消失した. また, Lys390 Arg, Lys445His, Lys445Arg の類似残基への変異では, 転移に対する水解の比率は減少する(転移性が相対的に回復する)こともわかった. 見かけの転移活性が消失した Trp への変異酵素について, 転移と水解による生成物を HPLC で定量したところ (Table 3), グルコース, マルトテトラオースなど水解物の生成量は, α , α -1,1 転移生成物のマルトトリオシルトレハロース量より多く, 水解活性が優勢になっていることが確認された. 特に, Lys390Trp 変異酵素の水解活性は転移活性の約 2 倍であった. 水解活性の K_m 値を測定したところ, 17.8 mM (Lys390Trp), 16.2 mM (Lys445Trp) と wild-type 酵素 (5.2 mM) の約 3 倍の値であり, それぞれ置換によって基質結合の親和性は低下していた.

以上の部位特異的変異解析の結果, 構造と機能との関連に関して重要な二つの知見が得られたと考えている. 一つは, 先に述べた α -アミラーゼファミリー酵素と共通する触媒残基 Asp228, Glu255, Asp443 に加えて, MTSase に特有な残基である His229, Glu393 も本酵素活性に必須であることと, もう一つは, Lys390, Asp394, Lys445 が本酵素の転移活性に関与している可能性が示唆されたことである.

立体構造

S. acidocaldarius の MTSase 蛋白をリジン還元メチル化した後, 結晶化を行った²⁴⁾. 得られた結晶を X 線

Table 2. Transglycosylation and hydrolysis activities of the mutations substituted for Lys390 and Lys445.

Mutation	Transglycosylation (A) (%)	Hydrolysis (B) (%)	(B)/(A) (%)
Lys390His	24.2	6.3	26.0
Lys390Gln	17.8	4.9	27.5
Lys390Arg	19.1	0.58	3.0
Lys390Trp	<0.7	3.3	>470
Lys390Ala	11.5	7.7	67.0
Lys390Glu	21.0	7.5	35.7
Lys390Thr	22.9	7.2	31.4
Lys445His	14.3	2.1	14.7
Lys445Gln	7.2	4.3	59.7
Lys445Arg	23.0	4.3	18.7
Lys445Trp	<0.7	2.5	>350
Lys445Ala	7.9	4.4	55.7
Lys445Glu	7.1	3.9	54.9
Lys445Thr	6.9	4.0	58.0
Wild-type	100	1.4	1.4

Table 3. Reaction products from maltopentaose by the Lys390Trp and Lys445Trp mutated MTSase.

Enzyme	Products (mol%)			
	G 1	G 2	G 4	G 3-Tre
Lys390Trp	40.9	1.6	38.0	19.5
Lys445Trp	35.5	1.4	33.4	30.3
Wild-type	1.0	0	0.3	98.7

G 1, G 3, G 4, and G 3-Tre mean glucose, maltotriose, maltotetraose and maltotriosyltrehalose, respectively.

結晶構造解析を行い、1.9Å分解能で立体構造を決定した。

MTSase の構造は、既に立体構造が決定されている α -アミラーゼファミリー酵素と基本的に類似しており、 β/α バレルを骨格とした構造であった。バレルの C 末端側にはクレフトが形成しており、クレフト構造も部分的に α -アミラーゼファミリー酵素のものと類似しており、このクレフトが MTSase の活性部位と考えられた。MTSase の立体構造の詳細については、別に報告することを予定しており、本稿では活性部位の一部分のみを概説する。

MTSase の活性部位を Fig. 4 に示す。活性部位の中心には、触媒残基として推定した Asp228, Glu255, Asp443 が、 α -アミラーゼの触媒残基とほぼ同じ位置に存在した。近辺には His90, Arg226, His442 など α -アミラーゼファミリー酵素で保存されている残基があり、それらは基質結合に関与していると考えられ、触媒残基とともにサブサイト-1 を構成していると思わ

Fig. 4. The active site structure of MTSase.

れた。クレフトの一端 (Fig. 4 の中央から左側) には、二つのループ (Loop 194-198, Loop 524-528) と一つのヘリックス (Helix 383-390) に囲まれた構造が存在しており、触媒基との位置関係からサブサイト+1 と推定された。サブサイト+1 には、部位特異的変異解析で指摘された His229, Lys390, Glu393, Asp394, Lys445 が存在した。興味あることに、転移に関与すると示唆された Lys390, Asp394, Lys445 はお互いに水素結合可能な構造であった。また、部位特異的変異によって大幅に活性減少をもたらした Asp231, Lys256, Tyr274 はいずれもサブサイト+1 周辺に存在し、その構造を維持しているように思われた。

現在、著者らは Fig. 5 に示すような MTSase 反応機構を考えている。

(1) まず、基質 (α -1,4 グルカン) が MTSase の活性クレフトに結合する。グルカンの還元末端グルコースは MTSase の二つのループと一つのヘリックスに囲まれたサブサイト+1 に結合する (おそらく、 α -アノ

Fig. 5. A possible mechanism for the α, α -1,1 transglycosylation of MTSase.

マーの基質のみがプロダクティブな結合を形成すると考えられる)。その隣の α -1,4 結合は触媒基 (Asp228, Glu255, Asp443) を跨ぎ、非還元側のグルカン鎖は α -アミラーゼと類似した構造のサブサイト-1などと結合する。

(2) 還元末端側の α -1,4 結合は、触媒基によって切断される。その切断は α -アミラーゼとほぼ同じ機構と考えられ、切断された結合の1位は触媒基などと相互作用して触媒中心に保持されている。切断された還元末端グルコースは、ループ構造の存在のためにサブサイト+1から遊離することができず、サブサイト中で約180°反転し、その1位水酸基 (α -アノマー) が触媒中心に接近するように位置する。

(3) 触媒中心に保持されていたグルカン鎖の1位は、その α -アノマーの方向からグルコースの1位水酸基 (α -アノマー) に転移する。その結果、 α -, α -1,1 結合が形成する。

この反応モデルは、先に提起した MTSase の特徴的な二つの性質、 α -1,4 グルカンの還元末端側に exo 型で作用することと、切断した還元末端グルコースの1位水酸基 (α -アノマー) に転移することを合理的に説明することができる。また、Fig. 4からもわかるように、二つのループはサブサイト+1を完全にふさいでいる構造ではなく、ループ構造の揺らぎなどを考慮すると、サブサイト+1からのグルコースの遊離または進入は可能と考えられ、そのことは MTSase が示すわずかなグルコース遊離活性や分子間転移活性をうまく説明することができる。しかしながら、反応の詳細な部分についてはこのモデルだけでは解釈ができない問題点も残されている。例えば、MTSase の転移反応は可逆的であり、サブサイト+1のグルコースの1位水酸基 (α -アノマー) だけでなく、4位水酸基にも転移可能である。しかし、1位水酸基 (α -アノマー) は axial で、4位水酸基は equatorial とそれぞれ異なる方向の水酸基である。 α -アミラーゼファミリー酵素の CGTase の場合、1位水酸基は equatorial の β -アノマーのみ利用されネオトレハロースが生成する²⁵⁾。なぜ、MTSase は axial の α -アノマー1位水酸基に転移できるのであろうか？ また、なぜ、グルコースの1位や4位以外の水酸基に転移しないのであろうか？ このような問題点を解決するためには、より詳細に構造解析、特に、基質 (アナログ) MTSase 複合体の立体構造解析が必要と考えている。

以上のように、著者らは MTSase の部位特異的変異解析と立体構造解析を行い、MTSase が α -アミラーゼ

ファミリー酵素と類似した酵素蛋白であることと、MTSase に特有と考えられる構造とを見出した。構造と機能との関連研究をさらに推し進め、MTSase 分子内転移反応機構の解明の一助としたい。

文 献

- 1) A.D. Elbein: The metabolism of α , α -trehalose. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **30**, 227-256 (1974).
- 2) T. Nakada, K. Maruta, K. Tsusaki, M. Kubota, H. Chaen, T. Sugimoto, M. Kurimoto and Y. Tsujisaka: Purification and properties of a novel enzyme, maltooligosyl trehalose synthase, from *Arthrobacter* sp. Q 36. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 2210-2214 (1995).
- 3) T. Nakada, K. Maruta, H. Mitsuzumi, M. Kubota, H. Chaen, T. Sugimoto, M. Kurimoto and Y. Tsujisaka: Purification and characterization of a novel enzyme, maltooligosyl trehalose trehalohydrolases, from *Arthrobacter* sp. Q 36. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 2215-2218 (1995).
- 4) T. Nishimoto, T. Nakada, H. Chaen, S. Fukuda, T. Sugimoto, M. Kurimoto and Y. Tsujisaka: Purification and characterization of a thermostable trehalose synthase from *Thermus aquaticus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 835-839 (1996).
- 5) 杉本利行, 久保田倫夫, 仲田哲也, 津崎桂二: 新規酵素による澱粉からのトレハロース製造. *農化*, **72**, 915-922 (1998).
- 6) K. Maruta, T. Nakada, M. Kubota, H. Chaen, T. Sugimoto, M. Kurimoto and Y. Tsujisaka: Formation of trehalose from maltooligosaccharides by a novel enzymatic system. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 1829-1834 (1995).
- 7) 渡辺 光, 山本拓生, 丸田和彦, 久保田倫夫, 福田恵温, 栗本雅司, 辻阪好夫: *Arthrobacter ramosus* S 34 由来のトレハロース生成酵素. *農化* (講演要旨), **73**, 39 (1999).
- 8) 丸田和彦, 山下 洋, 久保田倫夫, 福田恵温, 栗本雅司: *Arthrobacter* 属細菌におけるトレハロース (*tre*) オペロン. *農化* (講演要旨), **72**, 320 (1998).
- 9) T. Nakada, S. Ikegami, H. Chaen, M. Kubota, S. Fukuda, T. Sugimoto, M. Kurimoto and Y. Tsujisaka: Purification and characterization of thermostable maltooligosyl trehalose synthase from the thermoacidophile archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 263-266 (1996).
- 10) T. Nakada, S. Ikegami, H. Chaen, M. Kubota, S. Fukuda, T. Sugimoto, M. Kurimoto and Y. Tsujisaka: Purification and characterization of thermostable maltooligosyl trehalose trehalohydrolase from the thermoacidophile archaeobacterium *Sulfolobus acido-*

- caldarius*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 267–260 (1996).
- 11) K. Maruta, K. Hattori, T. Nakada, M. Kubota, T. Sugimoto and M. Kurimoto: Cloning and sequencing of trehalose biosynthesis genes from *Arthrobacter* sp. Q 36. *Biochim. Biophys. Acta*, **1289**, 10–13 (1996).
 - 12) K. Maruta, H. Mitsuzumi, T. Nakada, M. Kubota, H. Chaen, S. Fukuda, T. Sugimoto and M. Kurimoto: Cloning and sequencing of a cluster of genes encoding novel enzymes of trehalose biosynthesis from thermophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1291**, 177–181 (1996).
 - 13) K. Maruta, K. Hattori, T. Nakada, M. Kubota, T. Sugimoto and M. Kurimoto: Cloning and sequencing of trehalose biosynthesis genes from *Rhizobium* sp. M-11. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 717–720 (1996).
 - 14) M. Kato, K. Takehara, M. Kettoku, K. Kobayashi and T. Shimizu: Subsite structure and catalytic mechanism of a new glycosyltrehalose-producing enzyme isolated from the hyperthermophilic archaeum *Sulfolobus solfataricus* KM 1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 319–326 (2000).
 - 15) 阿賀 創, 渋谷 孝, 杉本利行, 福田恵温, 栗本雅司, 辻阪好夫: *Arthrobacter* sp. Q 36 由来, マルトオリゴシルトレハロース生成酵素のマルトトラオシルスクロースへの作用. 農化 (講演要旨), **70**, 296 (1996).
 - 16) A. Nakamura and K. Yamane: The primary structure of several amylolytic enzymes. in *Enzyme Chemistry and Molecular Biology of Amylases and Related Enzymes*, The Amylase Research Society of Japan, eds., CRC Press, Tokyo, pp. 83–87 (1994).
 - 17) Y. Matsuura, M. Kusunoki, W. Harada and M. Kakudo: Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase A. *J. Biochem.*, **95**, 697–702 (1984).
 - 18) Y. Morishita, K. Hasegawa, Y. Matsuura, Y. Katsube, M. Kubota and S. Sakai: Crystal structure of a maltotetraose-forming exo-amylase from *Pseudomonas stutzeri*. *J. Mol. Biol.*, **267**, 661–672 (1997).
 - 19) 久保田倫夫, 松浦良樹, 堺 修造, 勝部幸輝: シクロデキストリン合成酵素の立体構造と機能発現. 応用糖質科学, **41**, 245–253 (1994).
 - 20) Y. Katsuya, Y. Mezaki, M. Kubota and Y. Matsuura: Three-dimensional structure of *Pseudomonas* isoamylase at 2.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **281**, 885–897 (1998).
 - 21) 丸田和彦, 山下 洋, 久保田倫夫, 福田恵温, 栗本雅司: MTSase の部位特異的変異解析. 農化 (講演要旨), **71**, 153 (1997).
 - 22) 丸田和彦, 三鼓仁志, 仲田哲也, 池上庄司, 久保田倫夫, 茶園博人, 福田恵温, 栗本雅司: *Sulfolobus acidocaldarius* 由来のトレハロース生成遺伝子の大腸菌での高発現化. 農化 (講演要旨), **70**, 294 (1996).
 - 23) K. Hasegawa, M. Kubota and Y. Matsuura: Roles of catalytic residues in α -amylases as evidenced by the structures of the product-complexed mutants of a maltotetraose-forming amylase. *Protein Eng.*, **12**, 819–824 (1999).
 - 24) M. Kobayashi, M. Kubota and Y. Matsuura: Crystallization and improvement of crystal quality for x-ray diffraction of maltooligosyl trehalose synthase by reductive methylation of lysine residues. *Acta Crystallogr.*, **55**, 931–933 (1999).
 - 25) S. Kobayashi: Cyclodextrin producing enzyme (CGTase). *Prog. Biotechnol.*, **12**, 23–41 (1996).
 - 26) K. Kobayashi, M. Kato, Y. Miura, M. Kettoku, T. Komeda and A. Iwamatsu: Gene cloning and expression of new trehalose-producing enzymes from the hyperthermophilic archaeum *Sulfolobus solfataricus* KM 1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 1882–1885 (1996).
 - 27) Y.H. Kim, T.K. Kwon, S. Park, H.S. Seo, J.J. Cheong, C.H. Kim, J.K. Kim, J.S. Lee and Y.D. Choi: Trehalose synthesis by sequential reactions of recombinant maltooligosyltrehalose synthase and maltooligosyltrehalose trehalohydrolase from *Brevibacterium helvolum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 4620–4624 (2000).
 - 28) S.T. Cole, R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S.V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C.E. Barry, III, F. Tekaiia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, S. Oliver, J. Osborne, M.A. Quail, M.A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, S. Skelton, S. Squares, R. Squares, J.E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead and B.G. Barrell: Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, **393**, 537–544 (1998).
 - 29) H. Toda, K. Kondo and K. Narita: The complete amino acid sequence of Taka-amylase A. *Proc. Jpn. Acad.*, **58**, 208–212 (1982).
 - 30) M. Fujita, K. Torigoe, T. Nakada, K. Tsusaki, M. Kubota, S. Sakai and Y. Tsujisaka: Cloning and nucleotide sequence of the gene (*amyP*) for maltotetraose-forming amylase from *Pseudomonas stutzeri* MO-19. *J. Bacteriol.*, **171**, 1333–1339 (1989).
 - 31) 堺 修造, 久保田倫夫, 山本康三, 仲田哲也, 鳥越角二, 安藤 理, 杉本利行: *B. stearotheophilus* と *B. macerans* の CGTase 遺伝子のクローニングと構造解析. 澱粉科学, **34**, 140–147 (1987).
 - 32) S.H. Hong and J. Marmur: Primary structure of the maltase gene of the MAL 6 locus of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Gene*, **41**, 75–84 (1986).
 - 33) N. Katsuragi, N. Takizawa and Y. Murooka: Entire nucleotide sequence of the pullulanase gene of *Klebsiella aerogenes* W 70. *J. Bacteriol.*, **169**, 2301–

2306 (1987).

- 34) B.M. Krohn, G.F. Barry and G.M. Kishore: An isomylase with neutral pH optimum from a *Flavobacterium* species: Cloning, characterization and expression of the *iam* gene. *Mol. Gen. Genet.*, **254**, 469–478 (1997).
- 35) J.A.K.W. Kiel, J.M. Boels, G. Beldman and G. Venema: Molecular cloning and nucleotide sequence of the glycogen branching enzyme gene (*glgB*) from *Bacillus stearothermophilus* and expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Gen.*, **230**, 136–144 (1991).

【質問】

鹿児島大 菅沼

1) α, α -1,1 と α -1,4 結合でエネルギー的に余り差がないとすれば、還元末端由来のグルコースがサブサイト+1 に閉じ込められて「濃縮」して存在すると考えれば、あとは単純な平行論で α, α -1,1 結合形成が説明できるのではないのでしょうか？

2) α -アノマーの基質分子だけが酵素と結合するとすれば、末端グルコース分子のムタロテーションは必要ないのでしょうか？

【答】

1) MTSase の α, α -1,1 結合形成能の概容はその通りと推定しております。MTSase によるフラクトースの水酸基への転移（グルコースの場合と比べると微弱であるが）は非特異的であることがわかっています。それに対して、グルコースには 1 位（または 4 位）の水酸基（ α -アノマー）に特異的に転移します。この特異性が MTSase の反応機構の問題点と考えております。

2) 指摘のように、おそらく、 α -アノマーの基質のみがプロダクティブな結合可能と想像しております。

【質問】

江崎グリコ 栗木

MTSases の α, α -1,1 結合の形成は、いったん反応中間体ができた状態で、グルコースの C-1 に結合している OH のプロトンが、反応の第 1 段階でプロトンドナーとして働きプロトンを解離した状態にある Glu によって引き抜かれて、 α -アノマー側から攻撃すると考えられませんか？ たまたま、もともとの分子内のグルコースが何らかの機構で比較的導入され易い状態

になっていると考えられないでしょうか。例えば、 α -1,4 結合を α -1,6 結合につなぎ換えるブランチングエンザイムと同じ機構で説明できるとおもいますが。

【答】

詳しい機構はまだよく説明できませんが、おそらく、MTSase の反応機構のかかなりの部分は α -アミラーゼファミリー酵素と共通していると考えております。指摘の通りかもしれません。しかし、アクセプターグルコースの水酸基と酵素触媒基、さらにドナーグルカンの C-1 炭素との関係は、それらの構造や状態を含め、MTSase 反応にとって根本的に重要な問題点であり、今後の課題と認識しております。

【質問】

京府大 大西

G2 は結合するのか。基質にならないというが、観測しきれていないのではないか。分子内転移なら G2 は基質になるはずであると思うが？

【答】

通常の反応条件では、G2（マルトース、トレハロース）は基質とならない。しかし、指摘のように、観測しきれていない可能性は否定できない。例えば、高濃度マルトース中で、長時間、多量の酵素を作用させる条件で反応するかどうか、現在、不明です。

【質問】

花王 袴田

1) リジン変異酵素の酵素的性質の変化は？（pH、温度、比活性）

2) 活性クレフトのループの変異は？デレーション変異を含めて。

【答】

1) まだ、精製酵素での検討は行っておりません。おそらく、転移の比活性は 1/10 程度低下しており、水解の比活性は数倍に上昇していると考えております。

2) ループを対象とした変異はまだ行っておりません。重要な実験なので、是非、調べてみようと考えております。

(2000 年 11 月 28 日受付)