糖質関連酵素化学シンポジウム

CGTase の アミロース への作用

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)

Reaction of CGTase on Amylose

Yoshinobu Terada,* Haruyo Sanbe, Takeshi Takaha, Shigetaka Okada,
Sumio Kitahata and Kyoko Koizumi

Biochemical Research laboratory, Ezaki Glico Co., Ltd.

(4-6-5, Utajima, Nishiyodogawa-ku, 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-ku, Osaka 536-0025, Japan)

The action of cyclodextrin glucanotransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) on amylose was reinvestigated by determining the product specificity of the cyclization reaction and the substrate specificity of the coupling and hydrolytic reactions of CGTases from alkalophilic *Bacillus* sp. A2-5a (A2-5a CGTase), *Bacillus macerans* CGTase (Bmac CGTase) and *Bacillus stearothermophilus* CGTase (Bste CGTase). The product specificity of the cyclization reaction of CGTase was determined by quantifying each cyclic α -1,4-glucans with degree of polymerization (DP) from 6 to 31 (CD6 to CD31; CD_n, cyclic α -1,4-glucan with DP of *n*) produced at the initial reaction stage with HPAEC. All three CGTases produced CD6 to CD31 simultaneously. However, A2-5a CGTase produced more CD7, while Bmac CGTase produced more CD6 than other cyclic α -1,4-glucans. The specificity to produce CD7 or CD6 was very strict since the cyclic α -1,4-glucan having a difference of only one glucose unit were not preferably produced by either enzyme. On the other hand, Bste CGTase produced more CD6 and CD7 than other cyclic α -1,4-glucans, respectively. The substrate specificity of the coupling and hydrolytic reactions were determined by using CD6, CD7, CD8 and larger cyclic α -1,4-glucans (mixture of CD22 to CD50). For the coupling and hydrolytic activities of all three CGTases, CD7 and CD8 were extremely poor substrate, while those activities on larger cyclic α -1,4-glucans were higher than CD6, CD7 and CD8. The substrate specificity in the coupling and hydrolytic reaction could be attributed to the conversion of larger cyclic α -1,4-glucans into smaller ones. The hydrolytic activity of CGTases on larger cyclic α -1,4-glucans were 1/1.6 to 1/5 of the coupling activity, which indicated that the hydrolytic activity of CGTase was not so small as negligible. The hydrolytic activities of Bste CGTase were the highest among the three CGTases, while those of Bmac CGTase were the lowest, which would cause the difference in the conversion rate from larger cyclic α -1,4-glucans into smaller ones. Based on these results, we discussed the action of CGTase on amylose.

* Corresponding author.

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、グルカンの分子内転移反応 (環状化反応) を触媒し、重合度 6-8 の環状 α -1,4 グルカンを作成することを特徴とする酵素である (Fig. 1A). CGTase は環状化反応のほかに、その逆反応であるカップリング反応 (Fig. 1B), 分子間転移反応 (不均化反応, Fig. 1C), 加水分解反応 (Fig. 1D) も触媒する. CGTase 以外にも α -1,4 グルカンに作用して環状 α -1,4 グルカンを作成する酵素は存在するが、それらが作成する環状 α -1,4 グルカンの最小重合度は異なる (Table 1). 馬鈴薯 D-酵素が作成する環状 α -1,4 グルカンの最小重合度は 17¹⁾, amylomaltase は大腸菌で 17²⁾, *Thermus aquaticus* で 22³⁾, また少量で

はあるが *Bacillus subtilis* の α -アミラーゼも環状 α -1,4 グルカンを作成し、その最小重合度は 8 である⁴⁾. これらのほかにも *Thermococcus litoralis*⁵⁾ や *Pyrococcus* sp. KOD 1 の 4- α -glucanotransferase⁶⁾ も α -1,4 グルカンの環状化反応を触媒することが報告されている. 一方, *B. stearothermophilus* の branching enzyme も α -1,4 グルカンに作用して環状化反応を触媒するが、この酵素はグルカン鎖を受容体となるグルコース単位の 6 位の OH 基に転移するため、作成される環状 α -1,4 グルカンは環状構造内部に α -1,6 結合を含んでいる⁷⁾. これらの中で、CGTase は最も重合度の小さい環状 α -1,4 グルカンを作成する.

CGTase が反応の平衡状態で蓄積する環状 α -1,4 グルカンの重合度は 6-8 であり、それぞれ α -, β -, γ -シクロデキストリンと呼ばれている (ここでは、これらを CD6, CD7, CD8 と、また重合度 n の環状 α -1,4 グルカンを CD n と表記する). この平衡状態で蓄積する CD6, CD7, CD8 の割合は CGTase の種類により異なる. これら環状 α -1,4 グルカンは包接能をもち、包接した物質の溶解度や安定性を向上させる性質をもつため産業的な利用価値も高い. この性質は環状 α -1,4 グルカンの重合度により異なる⁸⁾. そのため、これまで特定の重合度の環状 α -1,4 グルカンを作る目的で、CGTase 生産菌のスクリーニング、環状 α -1,4 グルカン作成反応条件の検討、CGTase の人工的な改変など

Table 1. The smallest cyclic α -1,4-glucan produced by the enzymes to catalyze the cyclization reaction of α -1,4-glucan.

	DP ^a
CGTase	6
D-enzyme (potato)	17
Amylomaltase (<i>E. coli</i>)	17
Amylomaltase (<i>T. aquaticus</i>)	22
α -Amylase (<i>B. subtilis</i>)	8
Branching enzyme (<i>B. stearothermophilus</i>)	18 ^b

^a Degree of polymerization. ^b Cyclic α -1,4-glucans produced by branching enzyme contain an α -1,6-glucosidic linkage.

Fig. 1. Reactions of CGTase on α -1,4-glucan.

○, glucosyl residue; ●, glucosyl residue with reducing end; ▼, α -1,4-linkage cleaved by CGTase. A, cyclization; B, coupling; C, disproportionation; D, hydrolysis.

多くの研究が行われてきた。CGTase はすでにいくつかの酵素や酵素基質複合体の結晶構造も解明されている。その結果に基づいて、酵素の構造的な面からの環状化反応機構の解明も進んでいる。しかし現在までのところ、CGTase の環状化反応機構について明確な答えは得られていない。

CGTase はこれまで α -1,4 グルカンの非還元末端から順に作用して特異的に CD6, CD7, CD8 を合成すると信じられてきた。しかし馬鈴薯 D-酵素が CD17 以上の一連の環状 α -1,4 グルカンを合成できたという事実から、われわれは CGTase でもこのような環状 α -1,4 グルカンが合成されているのではないかと考えた。

CGTase による環状 α -1,4 グルカンの合成

馬鈴薯の D-酵素をアミロースに作用させたとき、反応初期に比較的高重合度の環状 α -1,4 グルカンが合成され、その後反応が進むに従ってそれらは低分子化される⁹⁾。われわれは、CGTase でも同様の反応が起っていると予想した。そこで、CGTase をアミロースに作用させ反応を経時的に停止し、合成された環状 α -1,4 グルカンを高性能陰イオンクロマトグラフィー (HPAEC) で分析した。CGTase はわれわれが土壌より単離した好アルカリ性 *Bacillus* sp. A 2-5 a 由来のもの (A 2-5 a CGTase) を最初に使用した⁹⁾。その結果、反応の初期には CD6, CD7, CD8 以外にも多くのピークが検出された。これらのピークが環状 α -1,4 グルカンであることは、TOF-MS による分子量の測定、および α -amylase, isoamylase, pullulanase を作用させたときの生成物の分析から確認した¹⁰⁾。反応初期に合成された高重合度環状 α -1,4 グルカンはその後低分子化され、平衡状態で CD6, CD7, CD8 が蓄積される。しかし、CD9 以上の環状 α -1,4 グルカン量は収率が最大約 50% にもなった¹⁰⁾。この結果は CGTase がアミロースの α -1,4 結合にランダムに作用していることを示していた。このことはその後、蛍光ラベルした澱粉を用いた研究からも支持されている¹¹⁾。

平衡状態で合成される CD6, CD7, CD8 の割合は CGTase の種類により異なり、最も多く合成される環状 α -1,4 グルカンの種類により CGTase は分類されている。そこで次に、異なる CGTase が合成する環状 α -1,4 グルカンの経時変化に興味をもたれた。最初に使用した A2-5a CGTase は CD7 を主として合成する CGTase である。これに加え、CD6 を主として合成する *B. macerans* 由来 CGTase (Bmac CGTase)¹²⁾ と、CD6 と CD7 をほぼ同量合成する *B. stearothermophilus* 由

来 CGTase (Bste CGTase)¹²⁾ が合成する環状 α -1,4 グルカンの経時変化も同じように解析した。このとき酵素量は、アミロースを基質としたときのヨード呈色が等しくなるようにそろえた。その結果、Bmac CGTase も反応初期に高重合度環状 α -1,4 グルカンを合成し、その後それらを低分子化し平衡状態で主として CD6, CD7, CD8 を蓄積することがわかった。しかし、平衡状態で CD6 が最も多く合成される点や、高重合度環状 α -1,4 グルカンを低分子化する速度が A2-5a CGTase より遅い点が異なっていた¹³⁾。それに対し Bste CGTase では反応初期から合成される環状 α -1,4 グルカンは主として CD6, CD7, CD8 であり、高重合度環状 α -1,4 グルカンはほとんど検出されなかった¹³⁾。これらの結果より CGTase は平衡状態で合成する環状 α -1,4 グルカンの組成以外に、環状 α -1,4 グルカン合成の経時変化においても差のあることがわかった。この差の原因を説明するために CGTase の反応をさらに解析した。

CGTase が合成する環状 α -1,4 グルカンの経時変化の説明

CGTase は環状化反応の他に、Fig. 1 にまとめたような反応も触媒する。その中で、合成される環状 α -1,4 グルカンの組成を直接決定するのは、環状化反応 (Fig. 1A) による環状 α -1,4 グルカンの合成と、環状化反応の逆反応であるカップリング反応 (Fig. 1B) および加水分解反応 (Fig. 1D) による環状 α -1,4 グルカンの分解である。

1. 環状 α -1,4 グルカンの合成 (環状化反応)

CGTase は一度合成した環状 α -1,4 グルカンに再度作用する。そのため、環状化反応の生成物特異性を調べるためには、反応の可能な限り初期に合成される環状 α -1,4 グルカンを重合度別に定量する必要があった。そこで、われわれはまず CGTase により合成された CD9-CD31 を単離し、それを用いて HPAEC で CD6-CD31 を個別に定量する方法を開発した¹⁴⁾。ここで単離された環状 α -1,4 グルカンのうち、CD10, CD14, CD26 はその後、結晶構造が解明された^{15,16)}。これらの環状 α -1,4 グルカンの結晶構造中には、CD9 以下にはない flip 構造の存在が確認された。この結果は、環状化反応機構や α -1,4 グルカンの構造を考える上でもたいへん興味深い知見であると思われる。

こうして開発した方法を用いて、できる限り反応初期の段階で各 CGTase が合成した環状 α -1,4 グルカンを解析した。その結果、A2-5a CGTase, Bmac CGTase

Fig. 2. Time course of the amount of each cyclic α -1,4-glucans with DP from 6 to 31 produced by the action of CGTase.

Synthetic amylose with an average molecular mass of 110 kDa (0.15% [w/v]) was incubated with CGTase from alkalophilic *Bacillus* sp. A2-5a (A), *B. macerans* (B) and *B. stearothermophilus* (C) for 20 (white bars), 40 (light gray bars), 60 (dark gray bars) and 80 min (black bars), respectively. Cyclic α -1,4-glucans with DP from 6 to 31 were separately quantified with HPAEC by using 200 pmol of maltopentaose as the internal standard. HPAEC was carried out by the DX-300 system (Dionex) with a pulsed amperometric detector, using a Carboapak PA-100 column (4 $\times$ 250 mm, Dionex).

に加え Bste CGTase でも CD6-CD31 の合成が確認された。このときに合成された CD6-CD31 の量を経時的に分析すると、すべての CGTase でほぼ一定の相対割合で増加していることがわかった (Fig. 2)。この CD6-CD31 量の相対割合は CGTase の環状化反応の生成物特異性を表す。すべての CGTase は CD6-CD31 を同時に合成していたが、A2-5a CGTase では CD7 のみ、Bmac CGTase では CD6 のみ、Bste CGTase では CD6 と CD7 をその他の環状 α -1,4 グルカンより高い頻度で合成していた (Table 2)。このことから、CGTase は環状化反応において CD6 以上の一連の環状 α -1,4 グルカンをほぼランダムに合成するという性質をもつと同時に、特定の環状 α -1,4 グルカン (CD6 あるいは CD7) を選択的に合成する性質ももっていることがわかった。この選択性は非常に高く、A2-5a CGTase の結果にみられるように、たとえ重合度が一つ異なる場合 (CD6 あるいは CD8 の合成) でも、その合成量は大きく低下していた (Fig. 2A, Table 2)。

CGTase による CD6-CD31 の合成速度は、アミロー

スの分子量により大きく影響を受ける。単位時間あたりに合成される環状 α -1,4 グルカンの重量が等しくなるように反応条件をそろえた場合、基質アミロースの分子量が 110 kDa から 10 kDa と低下すると、CD6-CD31 の合成速度 (mol/min) はどの CGTase の場合も約 10 倍高くなる。ところが CD6-CD31 の相対割合はそれほど大きく変動しなかった (Table 2)。このことから CGTase の環状化反応の生成物特異性は、少なくとも CD6-CD31 の合成において基質アミロースの重合度の影響を大きく受けないことがわかった。

2. 環状 α -1,4 グルカンの分解 (カップリング反応および加水分解反応)

CGTase の CD6, CD7, CD8 に対する加水分解活性が異なることはすでに知られている¹²⁾。このことから高重合度環状 α -1,4 グルカンに対する作用も CD6, CD7, CD8 と異なることが予想された。そこで、重合度の大きい環状 α -1,4 グルカンとして *T. aquaticus* 由来 amyloamylase により合成した CD22-CD50 の混合物を用い、各 CGTase のカップリング活性と加水分解

Table 2. Relative molar ratio of cyclic α -1,4-glucans with DP from 6 to 31 produced by the action of CGTase.

DP	A2-5a CGTase			Bmac CGTase			Bste CGTase		
	A ^a	B ^a	C ^a	A ^a	B ^a	C ^a	A ^a	B ^a	C ^a
6	1.05	0.52	0.52	34.3	31.6	34.0	12.2	16.6	14.7
7	9.80	10.9	14.5	1.08	1.16	1.52	3.29	4.54	3.47
8	1.09	1.20	1.51	0.86	0.91	1.09	1.12	1.41	1.29
9	1.00	1.08	1.18	0.89	0.87	0.99	1.03	1.20	1.18
10	0.66	0.64	0.60	0.71	0.68	0.69	0.79	0.77	0.81
11	0.76	0.79	0.76	0.76	0.83	0.81	0.86	0.86	0.89
12	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
13	1.03	1.03	0.98	1.03	1.04	0.96	1.06	1.01	1.02
14	0.98	0.94	0.84	0.99	0.96	0.83	1.03	0.94	0.95
15	0.91	0.84	0.70	1.01	0.95	0.79	0.95	0.85	0.84
16	0.91	0.83	0.68	1.05	1.02	0.83	0.94	0.82	0.81
17	0.96	0.91	0.74	1.11	1.10	0.91	0.96	0.86	0.83
18	1.00	0.97	0.80	1.12	1.12	0.91	0.95	0.84	0.82
19	1.00	0.97	0.80	1.09	1.08	0.85	0.93	0.82	0.78
20	0.98	0.95	0.76	1.07	1.04	0.79	0.91	0.81	0.76
21	0.94	0.89	0.68	1.04	1.01	0.74	0.88	0.75	0.71
22	0.91	0.85	0.62	1.06	1.00	0.71	0.87	0.73	0.68
23	0.90	0.85	0.59	1.06	1.01	0.70	0.85	0.72	0.66
24	0.92	0.86	0.59	1.07	1.02	0.69	0.89	0.73	0.67
25	0.92	0.85	0.58	1.04	0.98	0.65	0.87	0.71	0.64
26	0.91	0.85	0.57	1.05	0.98	0.64	0.87	0.72	0.64
27	0.89	0.83	0.55	1.04	0.99	0.64	0.87	0.70	0.61
28	0.89	0.82	0.55	1.06	1.00	0.65	0.86	0.68	0.59
29	0.88	0.82	0.54	1.05	0.99	0.64	0.84	0.67	0.58
30	0.88	0.82	0.54	1.05	1.00	0.65	0.84	0.66	0.58
31	0.87	0.81	0.53	1.04	0.99	0.64	0.83	0.66	0.56

^a Synthetic amylose (0.15% [w/v]) with a molecular mass of 110 kDa (A), 30 kDa (B) and 10 kDa (C) were used. All values were represented as the relative molar ratios to CD12.

Table 3. Coupling and hydrolytic activities of CGTases on cyclic α -1,4-glucans^a.

	Coupling (pmol/min) ^b			
	CD6	CD7	CD8	CD22-CD50
A2-5a CGTase	56.5	25.8	18.9	18.8
Bmac CGTase	35.7	0.889	0.974	97.5
Bste CGTase	336	22.3	31.3	638
	Hydrolysis (pmol/min) ^c			
	CD6	CD7	CD8	CD22-CD50
A2-5a CGTase	10.2	3.18	4.98	61.4
Bmac CGTase	7.70	0.503	0.862	17.9
Bste CGTase	79.5	11.4	17.3	390

^a All CGTases produce 1 μ g of cyclic α -1,4-glucans as glucose per min from synthetic amylose with a molecular mass of 110 kDa. ^b A reaction mixture (100 μ L) containing 0.5% (w/v) of a cyclic α -1,4-glucan, 0.02% (w/v) glucose and CGTase in 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.5) was incubated at 40°C for 10 min. The amount of glucose in the reaction mixture was measured. ^c A reaction mixture (100 μ L) containing 0.5% (w/v) of a cyclic α -1,4-glucan and CGTase in 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.5) was incubated at 40°C for 10 min. The reducing power of the reaction mixture was measured.

活性を測定し、CD6, CD7, CD8の結果と比較した。その結果、すべてのCGTaseでカップリング反応、加水分解反応とも、CD22-CD50を基質とした場合に最も高い活性を示した (Table 3)。また、すでに報告のあるように¹²⁾CD7, CD8はCGTaseの作用を大変受けにくい分子であることも、あらためて確認された。このCGTaseの環状 α -1,4グルカンの分解における基質特異性が、高重合度環状 α -1,4グルカンの低分子化の要因であると考えられた。

3. CGTaseが合成する環状 α -1,4グルカンの経時変化

CGTaseの種類の違いにより、環状 α -1,4グルカン合成の経時変化や平衡状態で合成される環状 α -1,4グルカンの種類が異なる¹³⁾。しかし、今回検討したCGTaseが合成する環状 α -1,4グルカンの経時変化はすべてFig. 3で説明できると思われる。反応の最初の段階で、CGTaseは直鎖グルカン (アミロース) に作用し環状 α -1,4グルカンを合成する (Fig. 3A)。このときCGTaseはTable 2に示した相対割合で環状 α -1,4グルカンを合成する。この生成物特異性はCGTaseの種類により異なり、A2-5a CGTaseではCD7が、Bmac CGTaseやBste CGTaseではCD6が最も多く合成される。その他のものはBste CGTaseの場合のCD7の例を除いて、ほぼランダムに合成される。この性質の違いはCGTaseが合成する環状 α -1,4グルカンの組成を決定する最も重要な要因である。また、これまで

多数解析されているCGTaseの結晶構造と合成される環状 α -1,4グルカンとの相関を考える上で最も重要な性質であると思われる。

次に、こうして合成された環状 α -1,4グルカンは再度CGTaseのカップリング活性あるいは加水分解活性により直鎖の分子に変換される (Fig. 3B)。このとき、CGTaseの基質特異性 (Table 3) により重合度の大きい環状 α -1,4グルカンが優先的に直鎖のグルカンに変換されるため、反応が進むに従ってその量は減少する。逆にCD7, CD8はCGTaseの作用を受けにくい。一方、1分子のアミロースにCGTaseが作用したときには、おそらく複数分子の環状 α -1,4グルカンが合成される。そのため、環状 α -1,4グルカンの分解の結果生成する直鎖グルカンの重合度は、最初に基質として使用した直鎖グルカンよりも小さくなると考えられる。これによる直鎖グルカンの低分子化もまた、高重合度環状 α -1,4グルカンの合成頻度の低下につながる。

以上のような反応を繰り返すことにより、反応の初期に合成された高重合度環状 α -1,4グルカンは反応の経過とともに低分子化され、最終的な平衡状態でCD6, CD7, CD8が反応液中に蓄積する。ここでCD6は、CD7, CD8に比べるとCGTaseの作用を受けやすいが、反応の経過に伴う直鎖分子の低分子化による合成速度の増加、あるいはBmac CGTaseのように環状化反応において選択的に合成されるために、最終的

Fig. 3. Model of the action of A2-5a CGTase on amylose.

Right arrows indicate the cyclization reaction, and left arrows indicate the linearization reaction including the coupling and hydrolytic reactions, where the relative width of each arrow represents the relative rate of reaction. The hydrolysis and disproportionation reactions of linear α -1,4-glucans are not shown. ∇ , α -1,4-linkages attacked by CGTase to produce cyclic α -1,4-glucans, where the relative size represents the relative frequency of the attack of CGTase as described in Table 2. $\circ$, glucosyl residue; $\bullet$, glucosyl residue with a reducing end.

な平衡状態で反応液中に蓄積するものと考えられる。CGTase はここで検討したもの以外にも合成される環状 α -1,4 グルカンの比率が異なるものも存在するが、それらの反応経過も同じように説明できると考えている。

4. その他の反応

CGTase は Fig. 1 に示したように、直鎖グルカン間の転移反応である不均化反応 (Fig. 1C) や直鎖グルカンの加水分解反応 (Fig. 1D) も触媒する。CGTase のアミロースへの作用においてこれらの反応も同時に行われていると考えられる。CGTase のアミロースへの作用を解析する場合、合成された環状 α -1,4 グルカンの分析は可能であったが反応液中の直鎖グルカンのみを取り出して分析することはできなかった。そのため、一連の研究で CGTase の不均化反応について検討できなかった。しかし不均化反応は直鎖グルカンの分布を変化させるが、平均分子量に影響を与えない。そのため CGTase により合成される環状 α -1,4 グルカンの組成に対し、全体として大きく影響しないと考えられる。ところが直鎖グルカンの加水分解は平均分子量

を低下させるために、合成される環状 α -1,4 グルカンの組成に影響を与える。

ここで CGTase が直鎖グルカンに作用したときの環状化反応と加水分解反応がどのくらいの割合で起こるかという点が問題となる。これを CGTase の反応初期における CD6-CD31 の合成速度と、還元力の上昇速度を同時に測定することにより見積もったところ、どの CGTase でも加水分解活性は、環状化反応の活性の 1/2-1/3 程度であった¹⁷⁾。このことは、Table 3 に示したカップリング活性と加水分解活性の比率からも支持される。ここでカップリング活性は環状 α -1,4 グルカンとグルコースのみが存在する状態で測定されている。このとき転移反応はカップリング反応しか起こり得ない。そのためここで測定したカップリング活性はこの反応条件における全転移活性であるといえる。一方、加水分解活性は同じ環状 α -1,4 グルカンの加水分解を測定している。確かに受容体としてグルコースが本当によい基質かどうかという点や、加水分解活性とカップリング活性を同時に測定していない点など問題点もある。それでも、CGTase の全転移活性と加水分

解活性の比率を見積もる一つの指標になるものと思われる。そういう観点から Table 3 の結果を見直してみると、加水分解活性に対する転移活性は、各活性が最も大きかった CD22-CD50 を基質とした場合の値から計算すると、A2-5a CGTase で約 3 倍、Bmac CGTase で約 5 倍、Bste CGTase で約 1.6 倍であった。このことから CGTase の加水分解活性が転移活性と比較して、決して無視できるほど小さいものではないと思われる。

CGTase の加水分解活性は直鎖グルカンに作用したとき、それを低分子化する。そのため高重合度環状 α -1,4 グルカンが合成されにくくなる。また、直鎖グルカンの非還元末端量が増加するため、それを受容体とするカップリング反応や環状化反応も加速されると考えられる。これらのことから CGTase の加水分解活性は、環状 α -1,4 グルカンに直接作用することも含めて、CGTase の反応全体を加速すると考えられる。アミロースに CGTase を作用させたときの加水分解活性は Bste CGTase で最も強く、Bmac CGTase で最も弱かった¹⁷⁾。各 CGTase の高重合度環状 α -1,4 グルカンを低分子化する速度の差は、この加水分解活性の強さの差で説明できると考えられた。このように、CGTase の加水分解活性は、環状 α -1,4 グルカン合成を説明する上で大変重要な要因であると思われる。

CGTase は α -amylase と比較して転移活性が強く、澱粉などに作用したときに生成する還元力も小さいことから、CGTase の加水分解活性は大変小さいものと考えられてきた。今回 CGTase の加水分解活性の強さが測定できた原因は、基質として高重合度のアミロースや重合度の大きい環状 α -1,4 グルカンを用いて、反応の極初期を分析したことにあると考えている。Table 3 に示したように CD6, CD7, CD8 は CGTase の作用を大変受けにくい分子である。そのため反応液中にこれらの分子が蓄積すると還元力の上昇速度が低下し、結果として加水分解活性が低く見積もられていたのではないかとと思われる。

おわりに

以上の結果より CGTase のアミロースへの作用についての理解がさらに進んだものと考えている。これまで CGTase の環状化反応は CD6, CD7, CD8 の合成割合で論じられることが多かった。CGTase の結晶構造に基づく反応機構も、その結果をもとに論じられてきたように思われる。今回 CGTase のアミロースへの作用について、Fig. 3 のように説明できることを示した。

今後この結果に基づいて、これまでの CGTase に関する研究結果を再度見直してみる必要があると思われる。そうすることにより、CGTase の構造に基づいた環状化反応機構もこれまで以上に解明されるものと期待している。

今回の一連の研究で、CGTase の加水分解活性が無視できるほど小さいものではないこともわかってきた。CGTase はこれまで α -amylase との比較において、典型的なグルカン転移酵素であり加水分解活性についてあまり論じられてこなかったように思われる。この CGTase の加水分解活性の強さは、CGTase とよく似た反応を触媒する amyloamylase との比較においてより明白になる。amyloamylase は CGTase と同様 α -amylase ファミリーに属する酵素で、 α -1,4 グルカンの分子間転移（不均化）および分子内転移（環状化）とその逆反応のカップリング反応など CGTase と同じ反応を触媒する。また加水分解活性も持つ³⁾。主な相違点は合成される環状 α -1,4 グルカンの最小重合度である（Table 1）。*T. aquaticus* 由来の amyloamylase の転移活性と加水分解活性を CGTase の場合と同じように CD22-CD50 を基質として見積もったところ、その転移活性は加水分解活性に比べて約 4800 倍も大きいという結果になった¹⁸⁾。このことは、amyloamylase が α -amylase ファミリー酵素の中でより理想的な転移酵素であることを示している。CGTase と amyloamylase の転移反応と加水分解反応はどちらも同一の活性中心で行われる。近年 *T. aquaticus* 由来 amyloamylase の結晶構造が解明された¹⁹⁾。ここで最初に注目された点は、合成される環状 α -1,4 グルカンの最小重合度を決定する機構であり、その点に関して大変興味深い知見が得られつつある。これに加えて、転移活性と加水分解活性の比率が異なる酵素として amyloamylase, CGTase, さらに α -amylase の構造を比較することは今後、 α -amylase ファミリーの酵素において転移活性と加水分解活性を決定している機構の解明にもつながるものと期待される。

文 献

- 1) T. Takaha, M. Yanase, H. Takata, S. Okada and S. M. Smith: Potato D-enzyme catalyzes the cyclization of amylose to produce cycloamylose, a novel cyclic glucan. *J. Biol. Chem.*, **271**, 2902-2908 (1996).
- 2) T. Takaha and S.M. Smith: The functions of 4- α -glucanotransferases and their use for the production of cyclic glucans. *Biotechnol. Gen. Eng. Rev.*, **16**, 257-280 (1999).

- 3) Y. Terada, K. Fujii, T. Takaha and S. Okada: *Thermus aquaticus* ATCC 33923 amyloamylase gene cloning and expression and enzyme characterization: Production of cycloamylose. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 910-915 (1999).
- 4) T. Nishimura, T. Kometani, T. Nakae, H. Takii and S. Okada: Cyclic α -1,4-glucan formation by bacterial α -amylases. *J. Ferment. Bioeng.*, **81**, 26-31 (1996).
- 5) B.-S. Jeon, H. Taguchi, H. Sakai, T. Ohshima, T. Wakagi and H. Matsuzawa: 4- α -Glucanotransferase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. Enzyme purification and characterization, and gene cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, **248**, 171-178 (1997).
- 6) Y. Tachibana, S. Fujiwara, M. Takagi and T. Imanaka: Cloning and expression of the 4- α -glucanotransferase gene from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus* sp. KOD 1, and characterization of the enzyme. *J. Ferment. Bioeng.*, **83**, 540-548 (1997).
- 7) H. Takata, T. Takaha, S. Okada, M. Takagi and T. Imanaka: Cyclization reaction catalyzed by branching enzyme. *J. Bacteriol.*, **178**, 1600-1606 (1996).
- 8) K.L. Larsen, T. Endo, H. Ueda and W. Zimmermann: Inclusion complex formation constants of α -, β -, γ -, δ -, ϵ -, ζ -, η - and θ -cyclodextrins determined with capillary zone electrophoresis. *Carbohydr. Res.*, **309**, 153-159 (1998).
- 9) T. Kometani, Y. Terada, T. Nishimura, H. Takii and S. Okada: Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus* species and transglycosylation at alkaline pHs. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 517-520 (1994).
- 10) Y. Terada, M. Yanase, H. Takata, T. Takaha and S. Okada: Cyclodextrins are not the major cyclic α -1,4-glucans produced by the initial action of cyclodextrin glucanotransferase on amylose. *J. Biol. Chem.*, **272**, 15729-15733 (1997).
- 11) M. Kobayashi and M. Kasuga: Further evidence for the random attack of cyclodextrin glucanotransferase on soluble starch. *J. Appl. Glycosci.*, **45**, 379-384 (1998).
- 12) S. Kitahata and S. Okada: Comparison of action of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus megaterium*, *B. circulans*, *B. stearothermophilus* and *B. macerans*. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **29**, 13-18 (1982).
- 13) 寺田喜信, 三瓶春代, 鷹羽武史, 岡田茂孝, 北畑寿美雄, 小泉京子: CGTase のアミロース環状化反応. 応用糖質科学, **46**, 207-215 (1999).
- 14) K. Koizumi, H. Sanbe, Y. Kubota, Y. Terada and T. Takaha: Isolation and characterization of cyclic α -(1 $\rightarrow$ 4)-glucans having degrees of polymerization 9-31 and their quantitative analysis by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *J. Chromatogr. A*, **852**, 407-416 (1999).
- 15) J. Jacob, K. Geßler, D. Hoffmann, H. Sanbe, K. Koizumi, S.M. Smith, T. Takaha and W. Saenger: Strain-Induced "Band Flips" in cyclodecaamylose and higher homologues. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **37**, 606-605 (1998).
- 16) K. Geßler, I. Usón, T. Takaha, N. Krauß, S.M. Smith, S. Okada, G.M. Sheldrick and W. Saenger: V-Amylose at atomic resolution: X-ray structure of a cycloamylose with 26 glucose residues (cyclomaltohexaicos). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 4246-4251 (1999).
- 17) Y. Terada, H. Sanbe, T. Takaha, S. Kitahata, K. Koizumi and S. Okada: Comparative study of the cyclization reactions of three bacterial cyclomalto-dextrin glucanotransferases. *Appl. Environ. Microbiol.*, in press.
- 18) 藤井和俊, 寺田喜信, 柳瀬美千代, 高田洋樹, 鷹羽武史, 岡田茂孝: *Thermus aquaticus* amyloamylase—CGTase との相違点について—。応用糖質科学 (講演要旨), **47**, 412 (2000).
- 19) I. Przytylski, K. Tomoo, Y. Terada, T. Takaha, K. Fujii, W. Saenger and N. Sträter: Crystal structure of amyloamylase from *Thermus aquaticus*, a glycosyltransferase catalyzing the production of large cyclic glucans. *J. Mol. Biol.*, **296**, 873-886 (2000).

【質問】

林原生化研 久保田

Bmac CGTaseはどうしてCD6のみを、またA2-5a CGTaseはCD7のみを特異的に作るのですか？ CGTaseの結晶構造との相関はあるのですか？

【答】

ご質問の内容につきまして、残念ながらまだわかりません。ご存知のように、CGTaseはすでにいくつかの結晶構造が解明されており、酵素-基質複合体の結晶構造もいくつか報告されております。これに加え部位特異的変異導入等により変異酵素が作製され、それらの反応生成物も多数解析されております。これらの結果をもとに環状化反応の機構について議論されてきております。しかしCGTaseの環状化反応機構についてまだ明確な答えは得られていないように思われます。この原因として、これまでの環状化反応生成物の分析がCD6、CD7、CD8の比率のみで議論されていたことや、その比率が研究ごとに異なった反応条件で求められていたことなどにあると考えております。今回の結果の中で、結晶構造との相関を考える上でCGTaseの環状化反応における生成物特異性を明らかにできたことが最も重要な点であると思われます。これに基づいてこれまでの研究結果を再検討することに

より、結晶構造と環状化反応の生成物特異性との関連の解明もより進むのではないかと期待しております。

【質問】

天野製薬 森

1) Bste CGTaseで、高重合度環状 α -1,4グルカンができていない場合と、そうでない場合があったが、これは反応条件の違いですか？

2) 環状化反応で高重合度環状 α -1,4グルカンが合成するときに、酵素は基質をどのように認識しているのですか？

【答】

1) おっしゃるように反応条件の違いです。Bste CGTaseは高重合度環状 α -1,4グルカンを低分子化する速度がたいへん速いのが特徴です。そのため反応条件によっては高重合度環状 α -1,4グルカンがほとんど検出できません。そこで反応条件を変更し、可能な限り初期に合成される環状 α -1,4グルカンを解析したところ、Bste CGTaseでも他の2種のCGTaseと同じように高重合度環状 α -1,4グルカンの合成が確認できまし

た。

2) CGTaseは重合度が60以上の環状 α -1,4グルカンも合成できますが、酵素分子がそのような環状 α -1,4グルカン分子全体を認識することは物理的に不可能であると考えられます。そのため、酵素分子は主に切断する α -1,4結合近傍のグルコース残基と、受容体となる非還元末端近傍のグルコース残基を主として認識していると予想しています。そのため、CGTaseの環状化反応の生成物特異性を説明するうえで、酵素分子の構造解析とともに基質分子の構造解析も必要になると考えております。現在までに、 α -1,4グルカンの環状化反応はCGTaseや馬鈴薯D-酵素の他にも、いくつかの酵素が触媒することがわかってまいりました (Table 1)。このことから、環状化反応はグルカン転移活性をもつ酵素に共通の性質であるように思われます。基質分子の構造解析はこの原因の解明にもつながるものと予想しております。

(2000年11月21日受付)