糖質関連酵素化学シンポジウム

3種のミツバチ α -グルコシダーゼアイソザイムの構造と機能

西本 完, 森 春英, 木村淳夫*, 千葉誠哉

北海道大学大学院農学研究科 (060-8589 札幌市北区北9条西9丁目)

Study on Three α -Glucosidase Isozymes from Honeybee, *Apis mellifera* L.

Mamoru Nishimoto, Haruhide Mori, Atsuo Kimura* and Seiya Chiba

Division of Applied Bioscience, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University
(Kita-9, Nishi-9, Kita-ku, Sapporo 060-8589, Japan)

The genes of three α -glucosidases (HBG I, HBG II and HBG III) were isolated from the cDNA library of honeybee, *Apis mellifera* L. The nucleotide sequences of HBG I, II and III were consisted of 1974, 1910 and 1916 base pair and encoding 588, 580 and 567 amino acid residues, respectively. The putative primary structures showed high homology ranging from N- to C-terminals, and three enzymes belonged to α -glucosidase family I, in which four conservative regions of α -amylase family were observed in their sequences. To obtain the recombinant enzymes, we tried to express the cDNAs in *Pichia pastoris* of heterologous host cells. Although recombinant HBG I was not produced, the recombinant HBG II and III of 2.4 and 1.2 U/mg were respectively expressed and secreted into culture supernatant. The active recombinant enzymes purified had the same properties as those of native ones except sugar content. To investigate the catalytic residues in HBGs, four mutated enzymes (D206N, E259Q, E269Q and D331N) of HBG III were constructed, and their specific activities were found to be 0.0004, 4.9, 0.004 and 0.0002 U/mg, respectively. E259Q remained half activity of wild type and those of the others disappeared, implying that three catalytic residues of HBGs were D212, E281 and D343 of HBG I, D202, E271 and D333 of HBG II, D206, E269 and D331 of HBG III. The homology modeling showed that three enzymes had N-domain ($(\beta/\alpha)_8$ barrel), subdomain, and C-domain (β -sheet structure mainly) like oligo-1,6-glucosidase from *Bacillus cereus*.

α -グルコシダーゼは主に α -1,4-グルコシド結合からなる基質を非還元末端側から加水分解する酵素であり α -グルコースを生成する。本酵素はその一次構造から二つのファミリー (Family IおよびII) に分類することができる¹⁾。Family IはHenrissatらの分類²⁾によるGH Family 13すなわち α -Amylase Familyに認められる活性発現に必須な四つの保存領域を含んでいる。その起源は*Saccharomyces*³⁾, *Bacillus*⁴⁾, *Candida albicans*⁵⁾, ショウジョウバエ⁶⁾, 蚊⁷⁾, など細菌や酵母, 昆虫類で主に見出されている。一方, Family IIは前述の保存領域を持たないタイプでGH Family 31の酵素と相同性があり, *Schizosaccharomyces pombe*⁸⁾, *As-*

*pergillus niger*⁹⁾, ヒト¹⁰⁾, ラット¹¹⁾, オオムギ¹²⁾, テンサイ¹³⁾, など酵母, カビ, 哺乳類, 植物などで多く見出される。

ミツバチ (*A. mellifera* L.) 成虫にはその体内にクロマトグラフィー操作によって分離できる3種の α -グルコシダーゼ (HBG I, IIおよびIII) が存在する^{14,15)}。これらはそれぞれ精製され, 諸性質について詳細な解析がなされている。酵素の物理化学的な性質は似ているが, 基質特異性に大きな違いが見られる。これら3種の α -グルコシダーゼの相違がどのような構造によるものなのかを調べるために, cDNAのクローニング, 異種細胞での発現系の構築, 触媒残基ならびに立体構造の推定を行った。

* Corresponding author (kimura@abs.agr.hokudai.ac.jp).

ミツバチ α -グルコシダーゼの生理的意義

ミツバチの生命は完全に「花」に依存している。花が分泌する花蜜がかれらのエネルギー源であり、花から採集する花粉がタンパク質源である。このような依存性はハチ類の1億年にわたる歴史から獲得されたものである。太古のハチは食植性であった。やがて、地上において繁栄していた昆虫類に産卵し、孵化した幼虫が宿主を食物とする寄生バチが現われた。その後、産卵した宿主を放置せず、自分が作った空間に確保する狩りバチが出現し、「巣」が発明された。狩りバチからハナバチへの進化は、食植性への復帰であるが、宿主とした昆虫に匹敵する栄養価の高い食物を「花」に見出したのである。すなわち、花蜜の糖濃度(30-40%, 50%以上のものもある)と花粉の粗タンパク質含量(20%以上, 30%のものもある)がなくては、ミツバチが属するハナバチは出現しなかったと考えられる。ミツバチは、狩りバチから育児行動と営巣技術を受け継ぎ・発展させ、他の昆虫に見られない社会性を獲得した。すなわち、ミツバチの名が示すように花に適応・進化して、種の保存・生息域の拡大をはかってきた。

ミツバチは花蜜をハチミツに転換する。両者の主たる相違は糖濃度と構成糖にある。前述したように花蜜の糖濃度は30-40%であり、その主成分はショ糖である。ハチミツは、ミツバチによる濃縮を受け80%をこえる糖濃度となり、主構成糖はグルコースとフルクトースである。高い糖濃度のハチミツを生成する生物的理由は、i) ハチミツ自体や花粉の腐敗防止と長期保存(花粉はハチミツに浸かった状態)、ii) 巣内の貯蜜に要する占有容積の減少、iii) 粘性増加による巣盤からの落下防止、iv) 断熱効果(巣の最外面に貯蜜圏があり、巣の中央に位置する育児圏の温度を35℃以上の一定温度にし、育児に理想的な温度環境を形成)、と考えられる。

ショ糖を加水分解しグルコースとフルクトースにする理由は明らかでないが、次の2点が想像される。ミツバチ成虫の中腸(ヒトの胃と腸に相当、食物は口腔→食道→蜜胃→中腸→小腸→直腸→肛門と運ばれる)では2種類のショ糖を分解する酵素、すなわち α -グルコシダーゼが分泌されている。仮に、30-40%のショ糖をミツバチが直接摂取すると、中腸内でグルコ二糖類や三糖類などの糖転移産物が生成される。三糖類はエルロースが主であるのでこれは再び加水分解され、ショ糖とグルコースになる。問題は、ニゲロース

やコージビオースなどの分解されにくい二糖類の蓄積にある。これらが小腸での吸収を免れて一部でも直腸に達すると、そこに存在する微生物により資化され菌数が増加する。ハチが自由に飛来できる夏期は排泄され問題はないが、越冬中のハチは排泄行動をしないので、二つの最悪の結果をまねく。微生物の増加で個体がそわそわし、巣内温度が上昇しハチミツの消費が早まり飢餓の危険性が高まる。それと、赤痢の発生である。養蜂業者は冬季における貯蜜の消費を恐れ、ショ糖溶液を与えるが、不純物の多いもの(特に、ミツバチ α -グルコシダーゼが分解できない澱粉を含むもの)は決して与えない。したがって、花蜜中のショ糖はあらかじめグルコースとフルクトースにしておかなくてはいけない。もう一つの理由は、寄生バチからの進化である。寄生バチの幼虫は他の昆虫の体内で成長する。その育成環境は栄養素に恵まれている。事実、ハチ類の幼虫の消化管は貫通しておらず、中腸とそれ以降で分断されている。排泄物は中腸に蓄積され、終齢幼虫が蛹化を開始すると同時に貫通し、排泄を行う(ミツバチでは最後の食事をしたとき)。したがって、宇宙食のような消化・吸収効率の高い食物が成長に必要となる。ミツバチ幼虫の食物も寄生バチの場合と同様にストレスの少ないものが選ばれ、難消化性のオリゴ糖を発生させ微生物増殖を促すショ糖の直接給餌を避けたと想像できる。寄生バチの育成環境を進化的に受け継いだことになる。

ミツバチの3種の α -グルコシダーゼ

花蜜ショ糖をハチミツのグルコースとフルクトースにする酵素は α -グルコシダーゼである。すなわち、30-40%の花蜜ショ糖(約1M濃度)を完全に加水分解できる酵素である。さらに濃縮後、80%の糖濃度(グルコースとフルクトースがともに約2.2M濃度)になるが、このような濃度でも生成物阻害を免れる酵素である。すなわち、異常に高い基質・生成物濃度で作用できる α -グルコシダーゼをミツバチが進化の末に獲得したことになる。われわれは、他の多くの α -グルコシダーゼが反応し難い異常な条件で作用できる酵素に着目した。

最初の試みは酵素精製であり、成虫から3種の α -グルコシダーゼの単離に成功し、諸性質を調べることができた。ポリクローナル抗体を用いた解析からHBG Iは羽化した数日後から中腸において分泌され、HBG IIは幼虫から成虫にいたるまで恒常的に中腸および動物の血液に相当する血リンパに存在すること、

HBG IIIは羽化後20日前後に頭部の下咽頭腺で発現し、唾液中に分泌されること、また、HBG IIIはハチミツ中に存在する α -グルコシダーゼと同一であることを確認した。これらのことからそれぞれの酵素のミツバチにおける役割としてHBG Iは消化に、HBG IIは血糖の調節に、HBG IIIはハチミツの生成に関与していると考えられる。

これら3種の α -グルコシダーゼの至適pHは5.0あるいは5.5、pH安定性は5.0から10あるいは12付近まで、温度安定性は40°Cまでと同様の性質を示し、また、分子量および糖含量はそれぞれ98,000、25% (HBG I)、76,000、15% (HBG II)、68,000、7.4% (HBG III)であり、いずれも糖タンパク質である^{14,15)}。一方、さまざまな基質に対する速度論解析から、3種の α -グルコシダーゼがそれぞれ異なった特徴を有していることが明らかになっている。HBG Iは糖転移活性が高く¹⁶⁾、またマルトース、ショ糖あるいはツラノースなどの一部の基質に対してs-vプロットがシグモイド型あるいはバースト型になり、正あるいは負の協同性を示すアロステリック酵素であった¹⁷⁾。HBG Iはモノマーであるので、報告例の極めて少ない単量体アロステリック酵素である。HBG IIは他の二つがほとんど作用しないニゲロース、イソマルトース、可溶性澱粉、グルコース-1-リン酸にも弱いながら作用でき、基質認識が広い酵素である¹⁸⁾。また、ショ糖の分解に対して正の協同性を示す。HBG IIIはほとんどの基質に対して、HBG IやHBG IIよりも K_m 値が高く、親和力が低い酵素であるが、ショ糖の加水分解に対する分子活性 k_0 が他の二つよりも高い¹⁵⁾。このことは上述のハチミツ生成という役割を担うために適応した結

果と考えるのが妥当である。以上のようにミツバチには特徴的な3種の α -グルコシダーゼが存在する。これらはN末端の構造、プロテアーゼ消化ペプチドのクロマトパターン（ペプチドマップ）やそれらのアミノ酸配列に相違が見出され、一次構造の異なるアイソザイムの可能性が示唆された。

一次構造

各精製酵素をリジレンドペプチダーゼで消化後、逆相HPLCで消化ペプチド断片を分離した。単離したいくつかのペプチド断片についてプロテインシーケンサーで内部アミノ酸配列を決定し、プローブ作製のためのプライマーを設計した。cDNAライブラリーはそれぞれの発現時期および発現部位を考慮し、内勤蜂の腹部および胸部のライブラリーと外勤蜂の頭部を用いたライブラリーの二つを構築し、HBG IおよびHBG IIは前者から、HBG IIIは後者から作製し、cDNAのスクリーニングを行った。得られたcDNAの特徴をTable 1に示した。HBG I、HBG IIおよびHBG IIIの成熟酵素部分はそれぞれ570、559、550アミノ酸残基からなり、計算される分子量は65,636、64,377、63,758であった。SDS-PAGEより評価したそれぞれの分子量との差は糖鎖によるものと考えられる。また、いずれも前述の α -Amylase Family保存領域が認められ、Family Iに属する α -グルコシダーゼであった。それぞれのアミノ酸配列解析からHBG IとHBG IIで38%、HBG IとHBG IIIで36%、HBG IIとHBG IIIで44%の同一性を有していることがわかり、保存性は全領域にわたって認められた。

Table 1. Properties of cDNAs and deduced amino acid sequences of honeybee α -glucosidases.

	HBG I	HBG II	HBG III
Full length (bp)	1974	1910	1916
Open reading frame (bp)	1767	1743	1704
Deduced amino acid residues	588	580	567
Leader peptide (residues)	18 ^a	21	17
Molecular weight (calculated)	65636 ^a	64377	63758
(SDS-PAGE)	98000	76000	68000
N-Linked sugar chain motif	18	14	8
Sugar content (%)	25	15	7.4
Regions for α -amylase	Conserved	Conserved	Conserved
α -Glucosidase family	Family I	Family I	Family I
Identity (%) HBG I	100	38	36
HBG II	38	100	44

^a These values were predicted from the basis of amino acid sequence.

Pichia pastoris における発現系の構築

最初に各アイソザイム遺伝子を pET ベクターに連結し、大腸菌での生産を試みたが、いずれも生産量が少ない上、大部分が封入体となってしまったことからメタノール資化性酵母 *P. pastoris* での生産を試みた。オリジナルあるいは α -Factor シグナル配列を持つ発現プラスミドをそれぞれ作製し、相同的組換えによる形質転換体をそれぞれ得た後、メタノールによる誘導後 50 時間の培養上清中のマルターゼ活性を測定した (Table 2)。HBG I に活性は認められなかったが、HBG II および HBG III について、どちらの発現プラスミドを用いた場合でもコントロールに比べ有意なマルターゼ活性を検出した。そこでオリジナルのシグナル配列を持つ組換え HBG II および HBG III について、

Table 2. Specific activities (measured as maltase) in the culture of *P. pastoris* transformants.

	Signal sequence	Specific activity (U/mg)
Control (no insert)	Original	0.004
	α -Factor	0.007
HBG I	Original	0.006
	α -Factor	0.007
HBG II	Original	2.4
	α -Factor	2.2
HBG III	Original	1.2
	α -Factor	0.8

イオン交換、ゲル濾過、疎水性クロマトグラフィーによる一連の操作で精製を行った。組換え HBG II を疎水性クロマトグラフィーに供した際、活性のピークが三つに分離し (Fig. 1)、糖含量が異なる組換え酵素が生産されたことがわかった。これらはマルトースに対する親和性に違いが見られず、全活性が最も高い Peak 1 画分を精製組換え HBG II とし、以降の実験に用いることとした。組換え HBG II および HBG III について諸性質を調べ、Native 酵素と比較した (Table 3)。SDS-PAGE では HBG II、HBG III どちらも移動度が小さくなっており (Fig. 2A)、分子量の増加が認められた。ただし、エンドグリコシダーゼ F

Fig. 2. SDS-PAGE of purified native and recombinant HBG II and HBG III.

M, molecular weight markers; 1 and 3, native HBG II; 2 and 4, recombinant HBG II; 5 and 7, native HBG III; 6 and 8, recombinant HBG III. Enzymes in lane 3, 4, 7 and 8 were treated with Endoglycosidase F.

Fig. 1. BUTYL-TOYOPEARL 650 M column chromatography of recombinant HBG II.

Column size, 1.5×23 cm; elution, 30–0% ammonium sulfate saturation in 20 mM sodium phosphate (pH 6.8); flow rate and fraction volume, 8.8 mL/h and 5 mL (fraction Nos. 1–27), 18 mL/h and 2 mL (fraction Nos. 28–155).

Table 3. Properties of native and recombinant HBG II and HBG III.

	HBG II				HBG III			
	Native	Recombinant			Native	Recombinant		
Optimum pH	5.1	5.3			5.5	5.7		
pH Stability (24 h, 4°C)	4.9–9.4	4.9–9.4			5.0–10.0	5.0–10.3		
Thermal stability (15 min)	<40°C	<37°C			<40°C	<40°C		
Molecular weight	76000	110000			68000	70000		
Sugar content	15.0%	21.2%			7.4%	10.0%		
	K_m (mM)	k_0 (s ⁻¹)	K_m (mM)	k_0 (s ⁻¹)	K_m (mM)	k_0 (s ⁻¹)	K_m (mM)	k_0 (s ⁻¹)
Maltose	5.4	27.0	2.7	32.9	11	37	13.3	39
Phenyl α -glucoside	1.6	72.5	1.2	82.9	23	148	28.7	148

処理によりそれら *N*-グルコシド結合型糖鎖を切断した場合、同じ移動度を与えることから (Fig. 2B), その違いが糖鎖によると考えられた。しかしながら、この相違が1本の糖鎖あたりの糖残基数が多いのか、それとも Native 酵素では付加していない部分にも糖鎖が結合しているためなのかは不明である。pH や温度に対する挙動および基質特異性に大きな違いは見られなかった。以上のように、糖含量は異なるが、Native 酵素と同様の性質を持つ組換え HBG II および HBG III を得ることができた。

触媒残基の同定および立体構造の推定

α -Amylase Family では保存領域内に存在する三つの酸性アミノ酸残基が直接、触媒として働いている^{19,20)}。立体構造が既知の酵素の中で HBG アイソザイムと最も相同性の高い (それぞれ約 30% の同一性) *Bacillus cereus* 由来オリゴ-1,6-グルコシダーゼ (PDB ID, 1UOK)²¹⁾ と配列解析を行い、その相同性から触媒残基を推定した。D 199, D 329 (1UOK) に対応するアミノ酸残基はそれぞれ D 212, D 343 (HBG I), D 202, D 333 (HBG II), D 206, D 331 (HBG III), と想定された。しかしながら、Region 3 周辺の相同性が低く、解析に用いる Matrix により E 255 (1UOK) に対応するアミノ酸残基に関して二つの保存されたグルタミン酸 (BLOSUM Matrix では E 259, および PAM Matrix では E 269, いずれも HBG III の場合) が候補となった。そこで前述の組換え HBG III を用い、部位特異的変異による変異酵素を作成し、触媒残基の同定を行った。各変異酵素の精製後の maltose に対する比活性を Table 4 に示した。E 269 Q では比活性がほぼ消失しているのに対し、E 259 Q では野生型の約半分の比活性

Table 4. Specific activities of mutated HBG IIIs.

	Specific activity (U/mg)
Wild type	10.0
D 206 N	0.0004
E 259 Q	4.9
E 269 Q	0.004
D 331 N	0.0002

が残存していた。このことから HBG III では D 206, E 269, D 331 が触媒残基であり、また相同性から HBG I および HBG II でも E 281 と E 271 が残りの触媒残基であると推察された。さらに、この PAM Matrix の配列解析結果をもとに解析プログラム GeneMine を用いて 1UOK とのホモロジーモデリングを行った。Fig. 3 に推定の二次構造を示し、1UOK に対応する構造には番号を付けた。二次構造の保存性も各アイソザイム間で高く、1UOK と同様に (β/α)₈ バレル構造の N ドメイン、その途中にあるサブドメイン、 β シート構造からなる C ドメインで構成されることが推定された。また、N α 8' が HBG I で欠失している以外、一次構造上の配列解析におけるギャップはほとんどループ部分に存在し、これらのループ構造の違いが各アイソザイム間の異なった機能を反映している可能性がある。

以上述べてきたように、筆者らはミツバチから3種の α -グルコシダーゼアイソザイム遺伝子を単離し、それぞれの一次構造を明らかにした。また、部位特異的変異によりその触媒残基を確認し、ホモロジーモデリングによる立体構造の推定を行った。これらの知見が今後、各アイソザイム間の詳細な構造と機能の相関

Amino acid sequences of HBG I, II and III were aligned by the CLUSTAL W program with PAM matrix. Secondary structures predicted by GeneMine program were shown using boxes (α -helix) and arrows (β -sheet). Structures corresponding to oligo-1,6-glucosidase from *Bacillus cereus* were seen on the boxes and arrows.

関係を知る手がかりになるものと期待される。

文 献

- 1) S. Chiba: Molecular mechanism in α -glucosidase and glucoamylase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 1233-1239 (1997).
- 2) B. Henrissat: A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.*, **280**, 309-316 (1991).
- 3) 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).
- 4) M. Nakao, T. Nakayama, A. Kakudo, M. Inohara, M. Harada, F. Omura and Y. Shibano: Structure and expression of a gene coding for thermostable α -glucosidase with a broad substrate specificity from *Bacillus* sp. SAM 1606. *Eur. J. Biochem.*, **220**, 293-300 (1994).
- 5) A. Geber, P.R. Williamson, J.H. Rex, E.C. Sweeney and J.E. Bennett: Cloning and characterization of a *Candida albicans* maltase gene involved in sucrose utilization. *J. Bacteriol.*, **174**, 6992-6996 (1992).
- 6) M. Snyder and N. Davidson: Two gene families clustered in a small region of the *Drosophila* genome. *J. Mol. Biol.*, **166**, 101-118 (1983).
- 7) A.A. James, K. Blackmer and J.V. Racioppi: A salivary gland-specific, maltase-like gene of the vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Gene*, **75**, 73-83 (1989).
- 8) M. Okuyama, A. Okuno, N. Shimizu, H. Mori, A. Kimura and S. Chiba: Carboxyl group of residue Asp647 as possible proton donor in catalytic reaction of α -glucosidase from *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur. J. Biochem.*, **268**, 2270-2280 (2001).
- 9) A. Nakamura, I. Nishimura, A. Yokoyama, D.G. Lee, M. Hidaka, H. Masaki, A. Kimura, S. Chiba and T. Uozumi: Cloning and sequencing of an α -glucosidase gene from *Aspergillus niger* and its expression in *A. nidulans*. *J. Biotechnol.*, **53**, 75-84 (1997).
- 10) F. Green, Y. Edwards, H.P. Hauri, S. Povey, M.W. Ho, M. Pinto and D. Swallow: Isolation of a cDNA probe for a human jejunal brush-border hydrolase, sucrase-isomaltase, and assignment of the gene locus to chromosome 3. *Gene*, **57**, 101-110 (1987).
- 11) G. Chandrasena, D.E. Osterholm, I. Sunitha and S.J. Henning: Cloning and sequencing of a full-length rat sucrase-isomaltase-encoding cDNA. *Gene*, **150**, 355-360 (1994).
- 12) B.K. Tibbot and R.W. Skadsen: Molecular cloning and characterization of a gibberellin-inducible, putative α -glucosidase gene from barley. *Plant Mol. Biol.*, **30**, 229-241 (1996).
- 13) H. Matsui, S. Iwanami, H. Ito, H. Mori, M. Honma and S. Chiba: Cloning and sequencing of a cDNA encoding α -glucosidase from sugar beet. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 875-880 (1997).
- 14) S. Takewaki, S. Chiba, A. Kimura, H. Matsui and Y. Koike: Purification and properties of α -glucosidases of the honey bee *Apis Mellifera* L. *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 731-740 (1980).
- 15) M. Nishimoto, M. Kubota, M. Tsuji, H. Mori, A. Kimura, H. Matsui and S. Chiba: Purification and substrate specificity of honeybee, *Apis Mellifera* L., α -glucosidase III. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 1610-1616 (2001).
- 16) A. Kimura, F. Yoshida-Kitahara and S. Chiba: Characteristics of transglucosylation of honeybee α -glucosidase I. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **51**, 1859-1864 (1987).
- 17) A. Kimura, S. Takewaki, H. Matsui, M. Kubota and S. Chiba: Allosteric properties, substrate specificity, and subsite affinities of honeybee α -glucosidase I. *J. Biochem. (Tokyo)*, **107**, 762-768 (1990).
- 18) S. Takewaki, A. Kimura, M. Kubota and S. Chiba: Substrate specificity and subsite affinities of honeybee α -glucosidase II. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **57**, 1508-1513 (1993).
- 19) H. Takata, T. Kuriki, S. Okada, Y. Takesada, M. Iizuka, N. Minamiura and T. Imanaka: Action of neopullulanase. Neopullulanase catalyzes both hydrolysis and transglycosylation at α -(1,4)- and α -(1,6)-glucosidic linkages. *J. Biol. Chem.*, **267**, 18447-18452 (1992).
- 20) B. Svensson: Protein engineering in the α -amylase family: Catalytic mechanism, substrate specificity, and stability. *Plant Mol. Biol.*, **25**, 141-157 (1994).
- 21) K. Watanabe, Y. Hata, H. Kizaki, Y. Katsube and Y. Suzuki: The refined crystal structure of *Bacillus cereus* oligo-1,6-glucosidase at 2.0 Å resolution: Structural characterization of proline-substitution sites for protein thermostabilization. *J. Mol. Biol.*, **269**, 142-153 (1997).

【質 問】

京都府大 大西

- 1) オリゴ-1,6-グルコシダーゼの構造解析はミツバチで行われたのか？
- 2) ショ糖を採取し、フルクトースを貯めるというハチミツの process が面白いので説明してください。

【答】

- 1) モデルとして用いたオリゴ-1,6-グルコシダーゼは *Bacillus cereus* 由来のものです。
- 2) 花蜜の主成分であるショ糖は蜜胃で下咽頭腺から分泌された HBG III の作用を受け、グルコースとフルクトースに分解されるとともに蒸発などで水分量が減少し糖濃度が上昇します。グルコースの一部はグルコースオキシダーゼによってグルコン酸に変換され pH が酸性側にシフトします。この高い糖濃度と低い pH が細菌などの増殖を抑制することでハチミツの長期保存を可能にしています。

(2001 年 11 月 19 日受付)