酸性 α -グルコシダーゼの活性部位に関する 反応速度論的研究†

(1990 年度農芸化学奨励賞受賞)

松 井 博 和

(北海道大学農学部)

酵素の持つ際立った特性の1つは、その特定の基質に対してのみ有効に発揮される触媒機能である。古くは、1つの酵素がただ1種の基質にのみ作用するものと考えられていた。しかし、アミラーゼ類やプロテアーゼ類のように、作用を受ける部位を共通に持つ一群を基質とするものも多い。 α -グルコシダーゼ [EC 3.2.1.20 α -Glucosidase] はそのような酵素の典型といえる。この酵素は生物界に広く存在し、その起源により基質特性が大きく異なる。今日では、エキソ様式に α -グルコシド結合を加水分解し、 α -グルコースを生成する一群の酵素を総称して α -グルコシダーゼと呼んでいる。

本研究は動・植物、微生物のグリコーゲンおよび澱粉の代謝上重要な位置を占める酸性 α -グルコシダーゼに関し、基質特性を速度パラメーターを用いて厳密に評価し、長年にわたる少糖と多糖の加水分解部位の単一性に関する疑問を種々の反応速度論的方法に基づいて解決するとともに、本酵素のほかいくつかの関連グリコシラーゼについて興味ある反応を触媒することを見出したものである。以下、項目別に概要を述べる。

I. 基質特性

従来 α -グルコシダーゼの特性は、基質のある一定濃度における速度の比較でなされていた。たとえば、マルトースや澱粉などの基質濃度を 0.2% (2 mg/ml) と一定にし、遊離グルコース量を比較するか、あるいは、基質の加水分解率を経時的に観察したものが多い。その結果、 α -グルコシダーゼはグルコアミラーゼと同様に α -グルコシド結合を水解してグルコースを生成するが、

前者はおもに少糖 (マルトースやマルトトリオースなど) によく作用し、多糖 (澱粉やグリコーゲン) には全く作用しないか、作用するとしてもそれは弱いものとされていた。後者はその逆である⁽¹⁾。このような特異性の評価法からは、酵素の各基質に対する真の水解能を比べることはできない。すなわち、反応速度比は基質濃度 (正確には K_m との相対的関係) によって一義的に決まるものではなく、極端な場合には、基質濃度の選び方によって速度の大小関係が逆転することもありうる。また、基質濃度とは反応を受ける部位の濃度のことであり、多糖では非還元末端側の α -グルコシド結合、いいかえれば、非還元末端グルコース濃度で表わされなければならない。

著者らはブタ肝臓⁽²⁻⁴⁾および血清⁽⁴⁾、ウサギ筋肉⁽⁶⁾、肝臓⁽⁶⁾および小腸^(7,8)、ミツバチ^(9,10)、テンサイ^(11,12)、スイートコーン⁽¹³⁾、コメ^(14,15)、モチゴメ^(16,17)、キビ⁽¹⁸⁾、トラマメ⁽¹⁹⁾、ウズラマメ⁽²⁰⁾、*Asp. niger*⁽²¹⁾、*Asp. oryzae*⁽²²⁾、*Paecilomyces varioti*⁽²³⁾ などの動物、植物、微生物から 20 種以上の酸性、中性 α -グルコシダーゼを均一な標品にまで精製し、それらの一般的諸性質を明らかにするとともに、少糖、多糖、合成基質等に対する特異性を速度パラメーター (K_m , k_0 , k_0/K_m) を用いて厳密に評価した。表 1 にテンサイ α -グルコシダーゼの基質特異性を示した。速度比は基質濃度が高い場合には分子活性 (k_0) の比に、基質濃度が低い場合には触媒効率 (k_0/K_m) の比に近づく。したがって、テンサイ α -グルコシダーゼは可溶性澱粉に対しマルトースの 1.2~88.4 倍の範囲内で作用しうることが理解された。このようにして、動物組織由来の酸性 α -グルコシダーゼや植物起源の α -グルコシダーゼは、少糖と同様に多糖をもよく水解することを明らかにした (表 2)。

テンサイ α -グルコシダーゼのように高分子基質によ

† Kinetic Studies on the Active Site of Acid α -Glucosidase.

Hirokazu MATSUI (Department of Agricultural Chemistry, Hokkaido University, Sapporo 060)

表 1 テンサイ α -グルコシダーゼの各種基質に対する速度パラメーター (基質特性)

Substrate	K_m^a	k_0^a	k_0/K_m^a
Maltose	20	149	7.5
G ₃ ^b	3.7	136	36.8
G ₄ ^b	2.3	136	59.1
G ₅ ^b	0.64	136	213
G ₆ ^b	0.42	136	324
G ₇ ^b	0.32	120	375
G ₈ ^b	0.23	85.1	370
G ₁₇ ^b	0.26	109	419
Kojibiose	1.3	16.0	12.3
Nigerose	17	195	11.5
Isomaltose	11	33.7	3.1
Panose	8.0	81.7	10.2
Phenyl α -glucoside	1.7	5.4	3.2
Soluble starch ^c	0.27	179	663
Shellfish glycogen ^c	6.0	53.9	9.0
Amylopectin ^c	0.21	20.0	96.2
β -Limit dextrin ^c	7.3	14.3	2.0

^a K_m , mM; k_0 , sec⁻¹, k_0/K_m , sec⁻¹·mM⁻¹^b α -1,4-結合のみから成るマルトオリゴ糖. 数字はグルコースの重合度を示す.^c これらの多糖では非還元末端グルコース濃度を求めた.表 2 各種 α -グルコシダーゼのマルトースと多糖水解力比

α -Glucosidase	k_0^a (P/M)	k_0/K_m^a (P/M)
Sugar beet	1.2	88.4
Rice I	1.1	3.0
Rice II	1.0	3.5
Glutinous rice I	1.2	3.3
Glutinous rice II	1.5	2.7
Buckwheat ^b	0.8	5.0
<i>Phaseolus vulgaris</i> (T) ^c	1.0	0.6
<i>Phaseolus vulgaris</i> (U) ^d	1.6	0.8
Sweet corn	1.3	0.3
Flint corn	3.0	1.5
Millet I	0.8	1.3
Millet II	0.6	2.8
Pig liver	0.7	0.8
Rabbit muscle	0.7	0.4
Rabbit liver	1.3	0.2

^a 単位は表 1 に同じ. P/M は多糖 (植物酵素では可溶性澱粉, 動物酵素ではグリコーゲン) とマルトースで得られた値の比.^b 文献 (24).^c トラマメの α -グルコシダーゼ.^d ウズラマメの α -グルコシダーゼ.

く作用するグルコアミラーゼ様 α -グルコシダーゼの発見は, グリコシダーゼの分類上においても重要な意味を持つ. α -グルコシダーゼとグルコアミラーゼの両酵素の区別は反応に基づいた規準, すなわち, 生成物のアノマー型 (α -グルコシダーゼでは α -グルコース, グルコアミラーゼでは β -グルコース) によらなければならないことがあらためて認識されることとなった. 著者らはガスクロマトグラフィーによる簡便かつ定量的な生成物のアノマー型決定法を示した⁽²⁵⁾. 生成物のアノマー型を確認することは酵素分類上必須なばかりでなく, 微視的な触媒機構を考察するうえで重要な情報を与えるものでもある.

速度パラメーターを用いての特異性の評価は各種起源 α -グルコシダーゼ間における直接的比較をも可能にし, さらに, サブサイト理論^(26,27)を応用することにより, それらの基質特異性をサブサイト親和力から説明できることを示した (図 1). すなわち, α -グルコシダーゼ間の多糖水解能の差異は第 4 番目以降のサブサイト親和力に大きく影響されること, α -グルコシダーゼとグルコアミラーゼ間では, いずれにおいても第 2 番目のサブサイト親和力が最大であるが, 第 1 番目と第 3 番目のサブサイト親和力は, 前者では常に第 1 > 第 3 であるのに対し,

図 1 α -グルコシダーゼとグルコアミラーゼのサブサイト親和力

矢印は触媒部位. A, テンサイ α -グルコシダーゼ (多糖をマルトースよりもよく水解); B, コメ α -グルコシダーゼ II (多糖をマルトースと同程度水解); C, ミツバチ α -グルコシダーゼ I (多糖を水解しない); D, *P. varioti* グルコアミラーゼ (文献 (28)).

後者では第1<第3であることを明らかにした。一般に、酵素活性部位のサブサイト構造を明らかにすることは、その作用様式を解析するうえで重要な示唆をあたえる。

II. 酸性 α -グルコシダーゼの少糖と多糖水解部位

1963年に Hers⁽²⁹⁾により、グリコーゲン蓄積症(Pompe病または糖原病Ⅱ型)が酸性 α -グルコシダーゼの欠損によることが明らかにされて以来、本酵素による少糖と多糖の水解反応が単一の活性部位で触媒されるのか、それとも、それぞれが別個の活性部位で触媒されるのか大きな関心が持たれていた。Fujimoriら(1968年)⁽³⁰⁾はウシ脾臓より本酵素を結晶として分離し、これがマルトースとグリコーゲンの水解反応では異なるpH活性曲線を示すこと、また、ツラノースによる阻害の受け方に両基質水解反応で相違が認められることから、それぞれの基質が別個の活性部位で作用を受けると推定している。また、Jeffreyら⁽³¹⁾はラット肝臓酸性 α -グルコシダーゼについて、Palmer⁽³²⁾はウサギ筋肉酸性 α -グルコシダーゼについて、BelenkiとRosenfeld⁽³³⁾はウサギ肝臓酸性 α -グルコシダーゼについて同様な推定を行っているが、いずれも満足すべき結論とは言い難い。

そこで、ブタ肝臓⁽³⁾、ウサギ筋肉⁽⁶⁾およびウサギ肝臓⁽⁶⁾の酸性 α -グルコシダーゼ、さらに、テンサイ⁽³⁴⁾やトラマメ⁽³⁵⁾等の酸性側に至適pHを持つ多くの植物 α -グルコシダーゼについて、少糖と多糖からなる混合基質系(マルトースとグリコーゲン、あるいは、マルトースと澱粉)での速度論的解析、少糖と多糖水解における活性解離基の同定、阻害剤や活性化剤の影響の解析、化学修飾法等に基づいて活性部位の検討を行った。

混合基質系の実験で得られた結果の一例を図2に示した。 $f=0$ は基質がグリコーゲンのみの、 $f=1$ はマルトースのみの場合のプロットである。 f を0.1から0.6までのそれぞれのモル分率(ここでは非還元末端グルコース濃度の分率)で両者を混合した場合、いずれの f のプロットも直線性を示し、かつ、両基質間の拮抗現象、最大速度(V)の単調な変動(増減)が認められた。これらは活性部位が単一である場合の条件を満たすものである。もし、それぞれの基質が全く独立した活性部位で水解されるならば、混合基質系での速度はそれぞれの各基質濃度に対応した2つの和となり拮抗現象は認められない。また、活性部位が別個であっても、基質が互いの部

図2 ウサギ肝臓酸性 α -グルコシダーゼによるマルトース-グリコーゲン混合基質系加水分解の両逆数プロット
 $f=(\text{マルトース})/(\text{マルトース}+\text{グリコーゲン})$ 、すなわち基質の非還元末端グルコース濃度によるモル分率を示す。各プロットは実験値。実線は両基質が共通の活性部位で加水分解されると仮定した場合の理論曲線。

位に結合しあうような場合や、基質の結合により他の活性部位の触媒作用に何らかの影響を及ぼすような場合にも拮抗現象が観察されると考えられるが、図とは異なりプロットの直線性が失われたり、 V の変動に異なった特徴が予測される。ところで、マルトース水解の速度パラメーターを $K_m \text{ mal}$, $V \text{ mal}$ 、グリコーゲン水解のそれらを $K_m \text{ gly}$, $V \text{ gly}$ とすると、活性部位が単一の場合の混合基質系における速度パラメーターは、それぞれ次式から求まる⁽³⁶⁾。

$$K_m = \frac{1}{f/K_m \text{ mal} + (1-f)/K_m \text{ gly}}$$

$$V = \frac{V \text{ mal} \cdot f/K_m \text{ mal} + V \text{ gly} \cdot (1-f)/K_m \text{ gly}}{f/K_m \text{ mal} + (1-f)/K_m \text{ gly}}$$

このようにして得られた理論値を図中の実線で示した。実験値のプロットとよく一致している。

酸性 α -グルコシダーゼ(植物酵素も含む)による少糖および多糖の水解反応においては、2種のカルボキシル基、すなわち、 $-\text{COO}^-$ と $-\text{COOH}$ が基質種に関係なく触媒作用に直接寄与していることが、 pK 値および解離熱の測定、低誘電率培地での pK 値の変化の観察から判明した。両基質水解反応で同じ活性解離基が関与するということは活性部位が共通であることを示唆する。

活性部位の検討とは別個に、ブタ肝臓および血清の中性 α -グルコシダーゼ⁽⁴⁾、中性域に至適 pH を持つビール酵母 α -グルコシダーゼ⁽⁹⁷⁾ の反応解離基を求め、中性 α -グルコシダーゼではカルボキシル基とヒスチジンのイミダゾール基が活性発現に必須な残基であることを明らかにし、酸性 α -グルコシダーゼとの明確な相違を示した(表 3)。

先に述べたように、他の研究者らは酸性 α -グルコシダーゼが複数の活性部位を持つと推定しているが、速度論的にそれは妥当ではない。すなわち、マルトースやグリコーゲン水解反応におけるそれぞれの pH 活性曲線のずれは、酵素が 1 つの活性部位を持つとしても、それぞれの基質に対する V と V/K_m の pH 依存性の差異から合理的な説明ができる。つまり、2 つの基質の K_m 、あるいは、反応の基質濃度が大きく異なる場合には、一方の基質では各 pH の V に、他方の基質では V/K_m の pH 依存性に近似した曲線を求めることになり、両者は必ずしも一致しない。また、それぞれの基質の水解反応における阻害剤の影響の相違についても、活性部位がいくつかのサブサイトからなることを考慮すれば容易に説明可能である。すなわち、阻害剤が触媒部位から少し離れたサブサイトにも結合するならば、マルトースとグリコーゲンのように重合度の異なる基質の水解反応では一様な阻害を受けず K_i 値に差が生ずることとなる。Na⁺ や K⁺ などの陽イオンは逆に酵素反応を促進するが、この場合の影響の受け方の相違も、阻害剤とは逆の作用だけで同様な理論で説明される。著者らが行った至適 pH、阻害剤および活性化剤の影響を求める実験においては、その差異は上述の方法で説明可能な範囲内のものであった。

以上のような種々の方法により得られた結果を総合的に考察することにより、酸性 α -グルコシダーゼは低分子基質も高分子基質もサブサイト構造からなる単一の活性部位で水解するものと結論した。

表 3 酸性および中性 α -グルコシダーゼの活性解離基

	解離基 1	解離基 2
酸性 α -グルコシダーゼ	-COO ⁻	-COOH
中性 α -グルコシダーゼ	-COO ⁻

III. グリコシラーゼの新しい触媒能とその機構

著者らは、 α -グルコシダーゼ、グルコアミラーゼ、グルコデキストラナーゼおよびトレハラーゼ等のグリコシラーゼが α -グルコシド結合を持たない特異な基質にも作用することを観察し、反応機構の解明を行った。

D-glucal はアノマー型を有さないプロキラル化合物である。結晶 *Asp. niger*、コメ、テンサイおよびブタ血清 α -グルコシダーゼはこれを基質とし、アノマー型を有する 2-deoxy-D-glucose を生ずることを明らかにした(図 3 A)⁽³⁸⁾。この水和反応の立体化学を D₂O 中反応物の ¹H-NMR 解析により調べた。その一例を図 4 に示した。

Asp. niger α -グルコシダーゼによる反応の経過とともに現われる生成物のシグナル (2.1, 2.25, 5.35 ppm) は、C-1 位の HOD は α -型であり、C-2 位に添加される D の立体化学は、基質由来のプロトンが equatorial であることから axial であることが理解される。このように、 α -グルコシダーゼによる反応では、プロトンは面の上部 (re-face) から入り、生成物は通常の α -グルコシド結合を有する基質からの水解産物と同様に α 型であることがわかった。また、*Arthrobacter globiformis* のグルコデキストラナーゼ、*Paecilomyces varioti* および *Rhizopus niveus* のグルコアミラーゼも同様に水和反応

図 3 グリコシラーゼによる D-glucal の水和反応(A)、D-glucitol の水和反応(B)、 α -D-glucosyl fluoride の C-F 切断反応(C)

を触媒した。これらの酵素では下面 (si-face) よりプロトンが入り、生成物のアノマー型は β であることを明らかにした。

結晶 *Asp. niger* とコメの α -グルコシダーゼ、さらに、*Trichoderma reesei* 由来のトレハラーゼは D-glucosyl-octenitol を D-glucosyl-octulose に転換する水和反応をも触媒することを明らかにした (図 3B)⁽³⁹⁾。本基質

も上記 D-glucal 同様プロキラル化合物である。反応による生成物のアノマーは、前者からのものは α 型、後者からのものは β 型であり、 α -グルコシダーゼによる水和反応は trans 型であるのに対し、トレハラーゼによる反応は cis 型であることを明らかにした。

α -グルコシダーゼは、元来、加水分解酵素として扱われているが、基質濃度の高い反応系では、より重合度の高い新たな糖を生成したり、結合様式の異なる糖を新生する^(40,41)。これは糖転移作用 (transglucosylation) と呼ばれ、一般に、グルコシラーゼ類のこのような反応は次式で表わされる。

このことはグリコシラーゼが glucosyl fluoride のような基質にも作用しうることを示唆する。そこで、*Asp. niger*, コメおよびテンサイ起源の α -グルコシダーゼ、*Rh. niveus*, *Asp. niger* および *P. varioti* 起源のグルコアミラーゼ、*A. globiformis* のグルコデキストラナーゼを α -D-glucosyl fluoride に作用させたところ、この基質の C-F 結合を切断することを確認した。すなわち、図 3C の反応を触媒し、 α -グルコシダーゼの反応では α -グルコースを、グルコアミラーゼやグルコデキストラナーゼの反応では β -グルコースを生じた。[1-²H]-D-glucosyl fluoride および [1-³H, 6-¹⁴C]-D-glucosyl fluoride を調製し、第二次アイソトープ効果を調べた結果、グルコアミラーゼやグルコデキストラナーゼの反応では明確な同位体置換効果が認められ⁽⁴²⁾、それらの反応がオキソカルボニウムイオン中間体を経て触媒されるものと推定した (図 5)。

図 4 *Asp. niger* α -グルコシダーゼの D-glucal 水和反応物の ¹H-NMR スペクトル
a, b, c, d, e: 反応時間 3, 8, 25, 90, 120 分

図 5 グルコアミラーゼおよびグルコデキストラナーゼによる α -glucosyl fluoride C-F 切断反応機構とその模式図

α -グルコシダーゼなどいくつかのグリコシラーゼが、 α -グルコシド結合を持たない化合物にも作用するという事実は大変興味深い。すなわち、酵素は基質の結合種を必ずしも必須なものとは認識しておらず、また、それらを取り込む部位はかなり自由度に富んでいることを示唆している。もし、基質が glucosyl fluoride のように比較的小さく、酵素の許容度の範囲内であれば、たとえ β -アノマー型であっても α -グルコシダーゼの作用を受ける可能性がある。このような観点から実験を行ったところ、 α -グルコシダーゼは β -glucosyl fluoride に、また、 β -グルコシダーゼは α -glucosyl fluoride に作用し、グルコースを遊離することを確認した⁽⁴³⁾。これらの反応においても、生成物のアノマー型は通常の基質からのものと同様であった。一般に、グリコシラーゼの反応は、ある程度柔軟性のある基質との結合と、厳密に規制された生成物の遊離の2つの相よりなるものと思われる。このような研究は、酵素活性部位の微細構造を推定するうえで有益な情報をもたらすものである。

本研究の遂行にあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました北海道大学農学部千葉誠哉教授に心からお礼申し上げます。研究の一部は、ニューヨーク市アルバート・アインシュタイン医科大学で行われたものであり、ご指導いただきました E. J. Hehre 教授、共同研究者の静岡大学教育学部岡田巖太郎教授に深く感謝いたします。また、北大農芸化学科生物化学講座、本間 守先生、木村淳夫博士、ならびに、当講座の卒業生、修了生諸氏の研究のご協力に対し厚くお礼申し上げます。

- (1) Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry: "Enzyme Nomenclature," Academic Press, London, 1984.
- (2) H. Matsui and S. Chiba: *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 707 (1983).
- (3) H. Matsui and S. Chiba: *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 715 (1983).
- (4) H. Matsui, T. Yamada, Y. Someya and S. Chiba: *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 1817 (1983).
- (5) H. Matsui, M. Sasaki, E. Takemasa, T. Kaneta and S. Chiba: *J. Biochem.*, **96**, 993 (1984).
- (6) S. Onodera, H. Matsui and S. Chiba: *J. Biochem.*, **105**, 611 (1989).
- (7) 小野寺秀一, 小田瑠里子, 三輪真敬, 木村淳夫, 松井博和, 千葉誠哉: *生化学*, **60**, 928(1988).
- (8) 三輪真敬, 小野寺秀一, 松井博和, 千葉誠哉: *農化*, **63**, 612 (1989).
- (9) S. Takewaki, S. Chiba, A. Kimura, H. Matsui and Y. Koike: *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 731 (1980).
- (10) A. Kimura, S. Takewaki, H. Matsui, M. Kubota and S. Chiba: *J. Biochem.*, **107**, 762 (1990).
- (11) S. Chiba, S. Inomata, H. Matsui and T. Shimomura: *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 841 (1978).
- (12) H. Matsui, S. Chiba and T. Shimomura: *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 1855 (1978).
- (13) H. Matsui, I. Yazawa and S. Chiba: *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 887 (1981).
- (14) S. Murata, H. Matsui, S. Chiba and T. Shimomura: *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 2131 (1979).
- (15) H. Matsui, H. Ito and S. Chiba: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1859 (1988).
- (16) H. Ito, S. Nakatsu, H. Matsui and S. Chiba: *Denpun Kagaku*, **36**, 148 (1989).
- (17) H. Ito, H. Matsui and S. Chiba: *Denpun Kagaku*, **36**, 156 (1989).
- (18) 松井博和, 大浦雅志, 千葉誠哉: *澱粉科学*, **32**, 249 (1985).
- (19) 水野昌博, 松井博和, 千葉誠哉: 昭和 57 年度日本農芸化学会大会講演要旨集, 1982, p. 426.
- (20) 松井博和, 関 靖彦, 千葉誠哉: 昭和 59 年度日本農芸化学会大会講演要旨集, 1984, p. 544.
- (21) 喜多昭彦, 松井博和, 千葉誠哉, 大矢隆一, 酒井敏秀: 昭和 59 年度日本農芸化学会大会講演要旨集, 1984, p. 545.
- (22) 喜多昭彦, 坂本悦弘, 松井博和, 千葉誠哉: 昭和 58 年度日本農芸化学会大会講演要旨集, 1983, p. 487.
- (23) 小熊哲哉, 松井博和, 谷田昌稔, 高尾彰一, 千葉誠哉: 昭和 57 年度日本農芸化学会大会講演要旨集, 1982, p. 427.
- (24) S. Chiba, K. Kanaya, K. Hiromi and T. Shimomura: *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 237 (1979).
- (25) S. Chiba, A. Kimura and H. Matsui: *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 1741 (1983).
- (26) K. Hiromi: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **40**, 1 (1970).
- (27) K. Hiromi, Y. Nitta, C. Numata and S. Ono: *Biochim. Biophys. Acta*, **302**, 362 (1973).
- (28) Y. Takeda, H. Matsui, M. Tanida, S. Takao and S. Chiba: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1633 (1985).
- (29) H. G. Gers: *Biochem. J.*, **86**, 11 (1963).
- (30) K. Fujimori, S. Hizukuri and Z. Nikuni: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **32**, 811

- (1968).
- (31) P. L. Jeffrey, D. H. Brown and B. I. Brown : *Biochemistry*, **9**, 1403, 1416 (1970).
- (32) T. N. Palmer : *Biochem. J.*, **124**, 701, 713 (1971).
- (33) D. M. Belenki and E. L. Rosenfeld : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 443 (1972).
- (34) H. Matsui and S. Chiba : *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 141 (1981).
- (35) H. Matsui : unpublished.
- (36) K. Hiromi, K. Takahashi, Z. Hamauzu and S. Ono : *J. Biochem.*, **59**, 469 (1966).
- (37) Y. Someya, H. Matsui and S. Chiba : *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 873 (1984).
- (38) S. Chiba, C. F. Brewer, G. Okada, H. Matsui and E. J. Hehre : *Biochemistry*, **27**, 1564 (1988).
- (39) W. Weiser, J. Lehmann, S. Chiba, H. Matsui, C. F. Brewer and E. J. Hehre : *Biochemistry*, **27**, 2294 (1988).
- (40) 下村得治, 千葉誠哉 : 化学と生物, **11**, 208 (1973).
- (41) 千葉誠哉, 下村得治 : 澱粉科学, **26**, 59 (1979).
- (42) H. Matsui, J. S. Blanchard, C. F. Brewer and E. J. Hehre : *J. Biol. Chem.*, **264**, 8714 (1989).
- (43) E. J. Hehre, H. Matsui and C. F. Brewer : *Carbohydr. Res.*, **198**, 123 (1990).
-