The Current Study of Cyclo-tetrasaccharide Focused on the Synthesizing System from Starch

澱粉からの生成系を中心とした環状四糖研究の現状

Nishimoto, Tomoyuki

Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc. 7-7 Amase-minami machi, Okayama 700-0834, Japan
FAX: +81-86-231-6738, E-mail: amaseken@hayashibara.co.jp

Key Words: *cyclo-tetrasaccharide, 1,6- α -glucosyltransferase, isomaltosyl transferase*

Abstract

There are many oligosaccharides synthesized enzymatically. However, these are very few kinds of nonreducing glucooligosaccharides synthesized from starch. Examples of such oligosaccharides are trehalose and cyclodextrins. Cyclo-tetrasaccharide (CTS; *cyclo*{ $\rightarrow$ 6)- α -D-glcp-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-glcp-(1 $\rightarrow$ 6)- α -D-glcp-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-glcp-(1 $\rightarrow$)}, is also one of the nonreducing glucooligosaccharides. A synthesizing system of this cyclic oligosaccharide from starch was recently found in *Bacillus globisporus* C11. CTS-synthesizing mechanism controlled by two enzymes and the sequence of the genes encoding them were reported in succession. These studies indicate that there is a good possibility of industrial production of CTS and a gene cluster related to the synthesis and transport of CTS is present in microorganisms. This review summarizes the current study of CTS by focusing on the CTS-synthesizing system from starch.

要 約

酵素的に合成されたオリゴ糖は数多くあるが、澱粉から合成される非還元性グルコオリゴ糖は、かなり少数である。そのような糖質の例として、トレハロースやシクロデキストリンがある。環状四糖 (CTS; *cyclo*{ $\rightarrow$ 6)- α -D-glcp-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-glcp-(1 $\rightarrow$ 6)- α -D-glcp-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-glcp-(1 $\rightarrow$)) もまた、非還元性グルコオリゴ糖の一種である。この環状オリゴ糖の澱粉からの生成系が、最近、*Bacillus globisporus* C11 株に見出され、二つの酵素が関与した CTS 生成機構およびそれらの遺伝子構造が相次いで報告された。これらにより、CTS の工業的製造の可能性と CTS の合成および輸送に関与する遺伝子クラスターの存在が示された。本レビューでは、澱粉からの環状四糖の酵素的生成系を中心に、最新の研究結果について記述する。

A. Introduction

Several investigators have reported the enzymatic synthesis of various cyclic oligosaccharides. Cyclodextrins (CDs; cyclic α -1,4-linked D-glucooligosaccharide), which are synthesized by cyclodextrin glucanotransferase (CGTase; EC 2.4.1.19) (1), are the best known cyclic oligosaccharides. Besides cyclodextrins, cycloinulo-oligosaccharide (cyclic β -2,1-linked D-fructooligosaccharide) (2,3,4) and cycloisomalto-oligosaccharide (cyclodextran; cyclic α -1,6-linked D-glucooligosaccharide) (5,6) are also well known. Di-D-fructose dianhydride synthesized by inulin fructotransferase (EC 2.4.1.93) (7–9) is also listed as a cyclic oligosaccharide that consists of two fructose molecules.

Cyclic oligosaccharides are not only chemically stable and resistant to exo-type glycosidases but also show various functions on the basis of their structure. CD molecules have a hydrophobic cavity region to form inclusion compounds (10); therefore, CDs are able to stabilize labile materials, mask odor,

A. はじめに

種々の環状オリゴ糖の酵素合成に関する報告がある。シクロデキストリン (CDs; α -1,4-結合からなる環状グルコオリゴ糖) は最もよく知られた環状オリゴ糖で、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ (CGTase; EC 2.4.1.19) により合成される (1)。他に、酵素合成された環状オリゴ糖としては、シクロイヌロオリゴ糖 (β -2,1-結合からなる環状フラクトオリゴ糖) (2–4) やシクロイソマルトオリゴ糖 (シクロデキストラン; α -1,6-結合からなる環状グルコオリゴ糖) (5,6) がある。イヌリンフラクトトランスフェラーゼ (EC 2.4.1.93) で合成される無水ダイフラクトースも、フラクトース二分子で構成される環状オリゴ糖である (7–9)。

環状オリゴ糖は化学的に安定であることやエキソ型グリコシダーゼでは分解できないといった特徴だけでなく、それぞれの構造に起因する種々の機能を発揮する。CD はその空洞による包接作用を持っており (10)、不安定な物質の安定化、臭気のマス

and change viscous or oily compounds into powder. In addition, cyclodextran strongly inhibits water-insoluble glucan synthesis by the glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* (11).

Cyclo-tetrasaccharide (CTS) described in this review is a new cyclic oligosaccharide. The only CTS-producing system so far known is from alternan. The polysaccharide alternan is a unique dextran produced from sucrose by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355 (12). It is composed predominantly from an alternating sequence of α -1,3-linked and α -1,6-linked D-glucose residues, with approximately 10% branching. Côté *et al.* tried to obtain an enzyme hydrolyzing alternan in an endo-fashion from soil microorganisms based on the idea that such an enzyme is also a unique glycosidase. This resulted in the isolation of *Bacillus* sp. NRRL B-21195 as producer of a novel type of endo-glucanase (alternanase) (13). Furthermore, it was found that there is CTS in the reaction mixture containing purified enzyme and alternan (14). This is the first report of a naturally produced CTS. Later they examined the substrate specificity of alternanase and reported that CTS was also produced from panose by the enzyme (15). Recently we obtained several soil microorganisms producing CTS from starch differently from Côté *et al.*, and investigated the enzymes and gene structure involved in CTS-production of *Bacillus globisporus* C11 among them.

B. CTS-Producing System from α -1,4-glucan in *B. globisporus* C11

CTS-producing enzymes were purified from culture supernatant of *B. globisporus* C11. As a result, it was found that CTS is produced by the sequential action of two kinds of enzymes: glucosyltransferase and glucanotransferase (16). The former was a 1,6- α -glucosyltransferase (6GT) catalyzing the α -

キングや粘性または油状化合物を粉末にすることができる。さらに、シクロデキストランは、 α -グルコシルトランスフェラーゼによる不溶性グルカンの生成を強く阻害する(11)。

本レビューで紹介する環状四糖 (CTS) は、新しく見いだされた環状オリゴ糖である。従来、アルタナンからの CTS 生成系のみが知られていた。アルタナンは、*Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355 がスクロースから合成する特殊なデキストランである(12)。その基本構造として α -1,6 結合と α -1,3 結合が交互に結合した直鎖からなり、約 10 % の分岐も存在する。Côté らはアルタナンを分解する酵素もまた特殊なグリコシダーゼであると考え、土壌分離菌からスクリーニングを行った。その結果、アルタナンを分解する新規なエンド-グルカナナーゼ (アルタナナーゼ) 生産菌として *Bacillus* sp. NRRL B-21195 株を得た(13)。さらに、精製酵素をアルタナンに作用させた時の反応液中に CTS が存在することを見出した(14)。これが、CTS の最初の発見である。その後、アルタナナーゼの基質特異性について検討し、パノースもまた本酵素の基質となり CTS が生成することを報告している(15)。我々は最近 Côté らとは別に、澱粉から CTS を生成する微生物を土壌から複数見出した。それら分離菌のひとつ、*Bacillus globisporus* C11 株について CTS 生成に参与する酵素および遺伝子構造について調べた。

B. *B. globisporus* C11 株の α -1,4-グルカンからの CTS 生成系

B. globisporus C11 株の培養液上清から酵素を精製したところ、CTS はグルコシルトランスフェラーゼとグルカノトランスフェラーゼの 2 つの酵素が連続的に作用することで生成することが明らかになった(16)。前者はマルトオリゴ糖 (MOS) の非還元末端にグルコシル残基 1 分子を α -1,6 転移する反応を触媒し

Fig. 1. Changes with time during reaction with maltotetraose by 6GT. A reaction mixture (10 ml) containing 0.1 g of maltotetraose and 0.02 unit of 6GT in 50 mM acetate buffer (pH 6.0) was incubated for the indicated time at 35°C. The sugar composition was calculated from the peak area of each sugar after HPLC with a YMC-Pack ODS AQ-303 column. ○, maltotriose; ●, α -isomaltosyl-(1→4)- α -maltose; △, maltotetraose; ▲, α -isomaltosyl-(1→4)- α -maltotriose; □, maltopentaose.

Fig. 2. Scheme for the formation of CTS from maltotetraose by 6GT and IMT. ○, glucosyl residue; ◊, reducing terminal glucosyl residue; —, α -1,4-linkage; |, α -1,6-linkage; \, α -1,3-linkage; /, α , β -1,1-linkage.

1,6-transglucosylation of one glucosyl residue to the nonreducing end of maltooligosaccharides (MOS) to produce α -isomaltosyl-MOS from MOS. The latter was an isomaltosyl transferase (IMT) catalyzing α -1,3-, α -1,4-, and α , β -1,1-intermolecular transglycosylation of isomaltosyl residues. In addition, IMT catalyzed cyclization, and produced CTS from α -isomaltosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- α -isomaltosyl-MOS by intramolecular transglycosylation.

Figure 1 shows the change with time during reaction with maltotetraose by 6GT. Alpha-isomaltosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- α -maltotriose was preferentially synthesized from maltotetraose and accumulated in the reaction mixture. It was clear that it is hard for this transfer product to become a donor and acceptor of 6GT. These characteristics of 6GT are distinct from those of other glycosidases catalyzing the α -1,6-transglucosylation, such as dextrin dextranase (EC 2.4.1.2) and α -glucosidase (EC 3.2.1.20) from *Aspergillus niger*.

When IMT reacted with panose, α -3³-isomaltosyl panose, α -4³-isomaltosyl panose and α -isomaltosyl β -panoside were synthesized as intermediates of final product CTS. Among the oligosaccharides, α -3³-isomaltosyl panose had the highest CTS production rate. Therefore, this oligosaccharide can be considered to be a direct substrate for producing CTS.

Figure 2 shows the scheme of a CTS-producing reaction from maltotetraose. 6GT provides a favorable substrate to IMT for the production of CTS and IMT synthesizes CTS from this substrate in a 2-step reaction. The reaction leading to CTS-production was thus organized by a remarkable harmony with 6GT and IMT. The mechanism of conversion of α -1,4-gluco-

α -イソマルトシル-MOS を生成する 1,6- α -グルコシルトランスフェラーゼ (6GT) であった。後者は α -イソマルトシル-MOS のイソマルトシル残基を α -1,3-, α -1,4-, α , β -1, 1 で分子間転移するイソマルトシルトランスフェラーゼ (IMT) であった。IMT は環化反応も触媒し、 α -イソマルトシル-(1 $\rightarrow$ 3)- α -イソマルトシル-MOS から分子内転移で CTS を生成する。

6GT をマルトテトラオースに作用させた反応経時変化を図 1 に示す。 α -イソマルトシル-(1 $\rightarrow$ 4)- α -マルトトリオースが優先的に生成し、蓄積した。この転移生成物は 6GT の供与体にも受容体にもなりにくいことがわかった。このような特性は、デキストリンデキストラナーゼ (EC 2.4.1.2) や *Aspergillus niger* 由来の α -グルコシダーゼ (EC 3.2.1.20) のような、他の 1,6- α -グルコシル転移活性を持つグリコシダーゼと著しく異なる点である。

IMT をパノースに作用させると、CTS 生成の中間体として、 α -3³-イソマルトシルパノース、 α -4³-イソマルトシルパノースおよび α -イソマルトシル β -パノシドが生成した。これらのオリゴ糖の中で、 α -3³-イソマルトシルパノースからの CTS 生成が最も速いことから、 α -3³-イソマルトシルパノースが CTS 合成のための直接の基質であると考えられる。

マルトテトラオースを基質にした場合の CTS 生成反応スキームを図 2 に示す。6GT は IMT にとって都合のよい基質を提供し、IMT はこの基質から 2 段階の反応で CTS を生成する。このように、6GT と IMT による CTS 生成反応は、両酵素の見事な調和の上に成立していた。 α -1,4-グルコシル結合を、 α -1,3 と α -

sidic linkage in α -1,4-glucan into α -1,3- and α -1,6-glucosidic linkage was beyond our imagination.

IMT is slightly different from alternanase described above in the effects of calcium ion and EDTA, optimum pH, and the isoelectric point. However, both enzymes are similar in that CTS and glucose are produced from panose (The action on alternan of IMT has not so far been examined.). There is a need to compare IMT with alternanase in detail to judge whether the enzymes are identical.

We examined a distribution of microorganisms having a CTS-producing system similar to *B. globisporus* C11. Among some 3,000 bacterial strains isolated from soil, *Arthrobacter* strains producing CTS from starch were obtained. It is interesting that there is also a similar enzymatic system in *Arthrobacter* strains, except for *Bacillus* strains. In the future, the difference in enzymes from both strains will be clarified through the study of CTS-producing enzymes from *Arthrobacter* strains. Such a CTS-producing system may be widely distributed in other microorganisms.

C. The Structure of Gene Cluster in *Bacillus globisporus* C11

The genes for IMT (Cts Y) and 6GT (Cts Z), involved in the synthesis of a CTS have been cloned from the genome of *B. globisporus* C11 (17). The amino-acid sequence encoded by the *ctsY* gene was composed of 1093 residues having a signal sequence of 29 residues in its N-terminus. The *ctsZ* gene encoded a protein consisting of 1284 residues with a signal sequence of 35 residues. Both of the gene products showed similarities to α -glucosidases belonging to glycoside hydrolase family 31 and conserved two aspartic acids corresponding to the putative catalytic residues of these enzymes (Fig 3). The *ctsZ* gene lay in the rear of the *ctsY* gene through a short flanking region of 55 bases. The two genes were linked together, forming *ctsYZ*. A transcription terminator-like sequence lay in the rear of the *Cts Z* gene.

1,6 結合に変換するというメカニズムは、我々の想像をはるかに越えるものであった。

IMT は先に述べたアルタナナーゼとカルシウムイオンや EDTA の影響、反応最適 pH および等電点などが僅かに異なっている。しかしながら、両酵素は共にパノースから CTS を生成するという点で非常に類似した酵素である (IMT のアルタナンに対する作用は検討されていない)。両酵素が同一の酵素であるか否かについては、さらに詳細に比較する必要がある。

我々は、本酵素系を持つ微生物の分布について検討した。およそ土壌分離菌 3,000 株についてスクリーニングした結果、同様の酵素系を持つ *Arthrobacter* 属細菌が見出された。*Bacillus* 属細菌の他に *Arthrobacter* 属細菌にも同様の酵素系が存在することは興味深い。今後、*Arthrobacter* 属細菌由来の CTS 生成に関与する酵素についても性質が調べられ、*B. globisporus* 由来の酵素との相違が明らかになるであろう。また、このような酵素系が他の微生物に広く分布している可能性は十分にあるだろう。

C. 遺伝子クラスター構造

CTS 生成に関与する IMT 遺伝子(*Cts Y*)と 6GT 遺伝子(*Cts Z*)が *B. globisporus* C11 株のゲノムからクローニングされた(17)。*CtsY* 遺伝子にコードされるアミノ酸配列は、1,093 残基(分子量: 120,302 Da)で、N末端側に 29 残基からなるシグナル配列を有していた。*CtsZ* 遺伝子にコードされるアミノ酸配列は、1,284 残基(分子量: 139,125 Da)で、N末端側に 35 残基からなるシグナル配列を有していた。両遺伝子産物は糖加水分解酵素ファミリー 31 に属する α -グルコシダーゼと相同性があり、ファミリー 31 の触媒残基と提唱される 2 つのアスパラギン酸も保存していた(図 3)。*CtsZ* 遺伝子は、*CtsY* 遺伝子の下流に 55 塩基対の短いフランキング領域を介して位置していた。このように、CTS 合成に関与する 2 つの遺伝子は連結し、*CtsYZ* を形成していた。*CtsZ* の下流には転写ターミネーター様配列が見出された。今回クローニングされた 16,515 bp の DNA 配列中には、

Enzymes	Region A	Region B
CtsW (<i>Bacillus globisporus</i> C11)	841- GFKTDGGEF	938- GWDLGGF
CtsY (<i>Bacillus globisporus</i> C11)	562- GFKTDGGEM	658- SWDMAGF
CtsZ (<i>Bacillus globisporus</i> C11)	429- GWWNDETDK	531- GMDTGGF
α -Glucosidase (<i>Aspergillus niger</i>)	486- GVWYDMSEV	687- GADTCGF
α -Glucosidase (<i>Candida tsukubaensis</i>)	522- GIWLD MNEP	769- GADICGF
α -Glucosidase (sugar beet)	465- GIWLD MNEA	595- GADICGF
Acid α -glucosidase (human lysosomal)	514- GMWLD MNEP	643- GADVCGF
Isomaltase (rabbit intestinal)	501- GLWLD MNEV	631- GADICGF

Fig. 3. Regional sequence homology among the CTS-forming enzymes and the family 31 α -glucosidases. The putative catalytic residues are shadowed. Alpha-glucosidase from *Aspergillus niger* is the accession number, P56526, in Swiss-prot; from *Candida tsukubaensis*, P29064; from sugar beet, O04931. Acid- α -glucosidase from human lysosome, P10253. Isomaltase (IM) and sucrase from rabbit intestine, P07768.

The DNA sequence of 16,515 bp cloned in this study contained four open reading frames (ORF1-4) upstream of *ctsYZ*.

ORF-1 (*ctsU*)

ORF-1 was an incomplete ORF missing the 5'-region. The amino-acid sequence (209 residues) deduced from the ORF showed similarities to the C-terminal regions of a hypothetical permease of the sugar transport system encoded by the gene BH1926 from *Bacillus halodurans* C-125 (18) and a CD-binding protein-dependent permease from *Thermococcus* sp. B1001 (19). These sequence similarities suggest that the ORF-1 products may be members of the CTS-binding protein-dependent ABC transport system.

ORF-2 (*ctsV*)

ORF-2 lay in the rear of the incomplete ORF-1 through a 98-bp flanking region. The structural gene encoded a protein with 449 amino-acid residues (calculated molecular mass of 49,553 Da). The putative protein was similar to a CD-binding protein from *Thermococcus* sp. B1001 (19) and to a periplasmic solute-binding protein of the sugar uptake ABC transporter from *Rhizobium meliloti* (20). These sequence similarities suggest that the ORF-2 products may be CTS-binding proteins.

ORF-3 (*ctsW*)

ORF-3 encoded a protein with 1237 amino-acid residues not having a signal sequence (calculated molecular mass of 138,846 Da). The C-terminus amino-acid sequence of the ORF-3 protein showed a significant similarity to the N-terminus part of *CtsY*. The expression experiment showed that the ORF-3 protein produces CTS from panose and not from either 6-glucosylated glycogen or starch. It was suggested that the protein is a kind of IMT preferring low-molecular-mass substrates to high-molecular-mass ones. The difference of substrate-preference between ORF-3 protein and IMT may be caused by the lack of the putative sugar-binding C-terminal domain. The ORF-3 protein may be an intracellular protein and catalyze another CTS-producing reaction differently from the extracellular IMT.

ORF-4 (*ctsX*)

ORF-4 lay between ORF-3 and *ctsY* genes, and encoded a small protein of 144 amino-acid residues (16,438 Da). The similarity was insufficient for characterization of the ORF-4 product, and it remains an unknown protein.

As described above, it seems that *ctsUVWXYZ* is a gene cluster related to CTS (Fig.4). In the case of CDs, *cgtBACDE* cluster was found in the genome of *Thermococcus* sp. B1001; *CgtB* for the intracellular CD-degradation enzyme, *cgtA* for the extracellular CD-synthesis enzyme (CGTase), *cgtC* for the CD-binding protein, *cgtDE* for the membrane transporter proteins (19). It has been reported that *Klebsiella oxytoca* M5a1 has a CD-synthesis/uptake/degradation system similar to that of *Thermococcus* (21).

*CtsYZ*の上流に4つのオープンリーディングフレーム (ORF-1~4) が存在していた。

ORF-1 (*ctsU*)

ORF-1 は、5'-領域が欠落した不完全な ORF であった。この ORF から推定されるアミノ酸配列 (209 残基) は、*Bacillus halodurans* C-125 由来 BH1926 遺伝子がコードしている糖輸送系の推定パーミアーゼ (18) や *Thermococcus* sp. B1001 由来 CD 結合蛋白質依存性パーミアーゼ (19) と相同性を有していた。この相同性は ORF-1 蛋白質が CTS 結合蛋白質依存性 ABC トランスポーター系の一つである可能性を示唆している。

ORF-2 (*ctsV*)

ORF-2 は、ORF-1 の下流に 98 塩基対のフランキング領域を介して存在していた。この遺伝子は 449 残基 (分子量: 49,553 Da) の蛋白質をコードしていた。その推定蛋白は、*Thermococcus* sp. B1001 由来 CD 結合蛋白質 (19) や *Rhizobium meliloti* 由来糖取り込み ABC トランスポーターの periplasmic solute-結合蛋白質 (20) と相同性を有していた。この相同性は ORF-2 蛋白質が CTS 結合蛋白質である可能性を示している。

ORF-3 (*ctsW*)

ORF-3 は、1,237 残基 (分子量: 138,846 Da) のシグナル配列を有しない蛋白質をコードしていた。ORF-3 蛋白質の C 末端アミノ酸配列は *CtsY* の N 末端部分と高い相同性を持っており、ORF-3 蛋白質の発現試験を行ったところ、ORF-3 蛋白質はパノースから CTS を生成するが、6GT で非還元末端が 6-グルコシル化されたグリコーゲンや澱粉には作用しないことがわかった。この蛋白質は高分子量基質より低分子量基質を好む IMT の一種であると考えられた。ORF-3 蛋白質と IMT の基質特異性の相違は、C 末端糖結合ドメイン欠落により生じているのかもしれない。ORF-3 蛋白質は菌体内蛋白質で、IMT とは異なる別の CTS 生成反応を触媒している可能性がある。

ORF-4 (*ctsX*)

ORF-4 は ORF-3 と *CtsY* 遺伝子の間に存在し、144 アミノ酸残基 (分子量: 16,438 Da) という小さな蛋白質をコードしていた。ORF-4 蛋白質と明白な相同性は見出されず、その機能はわかっていない。

このように、*ctsUVWXYZ* は CTS に関連する遺伝子クラスターを形成していた (図 4)。CDs の場合、*cgtBACDE* クラスター (*CgtB*: 菌体内 CD 分解酵素、*cgtA*: 菌体外 CD 合成酵素 (CGTase)、*cgtC*: CD 結合蛋白質、*cgtDE*: 膜輸送系蛋白質) が *Thermococcus* sp. B1001 のゲノム中に見出されている。*Klebsiella oxytoca* M5a1 は *Thermococcus* と同様、CD 合成/取り込み/分解系を持つことが報告されている (21)。

Fig. 4. Structure of the gene cluster containing genes for synthesis and transport of CTS in *B. globisporus* C11.
Arrows show the localization of each gene and the orientation of the coding sequences.

D. Examination of Reaction Conditions for Synthesizing CTS from Starch

Since CTS was found, no progress has been accomplished in the study of its applications. The reason seems to be that it has been difficult so far to produce CTS in large quantities and at a low price because alternanase requires particular substrates such as alternan or panose.

Trehalose has been a well-known saccharide for a long time. However, its applications were restricted, because of its high price. A new industrial manufacturing process of trehalose from starch was developed by using two enzymes (22,23), maltoligosyltrehalose synthase (EC 5.4.99.15) and maltoligosyltrehalose trehalohydrolase (EC 3.2.1.141) in recent years. Consequently, the price of trehalose fell drastically. As a result the applications have spread to the food industry, and novel functions of trehalose have become apparent (24). If mass-production method of CTS from inexpensive starch could be developed as in the case of trehalose, the spin-offs would be enormous.

The reaction conditions for CTS synthesis were examined using 6GT and IMT from *Bacillus globisporus* C11 (16,25). When the substrate is MOS, the yields of CTS increased with the increasing degree of polymerization of MOS (16). Furthermore, when the substrate is partial hydrolyzate of starch, the yields of CTS increased with decreasing hydrolysis percentage (25). Interestingly, glycogen was the most suitable substrate for CTS synthesis and the CTS yields reach 80% or more. It is known that when the substrates are debranched by isoamylase, the CTS yields decrease significantly. These suggest that the α -1,6-branched structure proves to be favorable to the CTS synthesis (25).

The optimum reaction conditions to obtain CTS from

D. 澱粉からの生成条件の検討

CTSが発見されて以来、その用途に関する研究はあまり進展していない。これは、CTSの製造にアルタナンまたはパノースという特殊な基質を要し、そのため大量に安価にCTSを製造することが困難であるためと考えられる。トレハロースは古くから知られている糖質であるが、高価であったため、その応用は制限されていた。近年、2つの酵素、マルトオリゴシルトレハロースシンターゼ (EC 5.4.99.15) とマルトオリゴシルトレハローストレハロハイドロラーゼ (EC 3.2.1.141) による澱粉からのトレハロースの工業的製造法が開発され (22,23)、一挙に価格が下がり、用途が食品にまで拡大すると共に、新規機能が明らかになった (24)。トレハロースと同様に、CTSの安価な澱粉からの工業的製造法が確立されれば、その恩恵はとて大きい。

B. globisporus C11株由来の6GTとIMTを用いたCTS反応条件が検討された (16,25)。基質がMOSである場合、MOSの重合度が増加するに従いCTS生成率が高くなり、澱粉部分分解物の場合、加水分解率が低いほど、CTS生成率が高くなった。また、興味深いことに、グリコーゲンが最もよい基質で、CTS生成率は80%以上になった。反応液にイソアミラーゼを添加し枝切り処理した場合、CTS生成率が低下することからも、分岐構造をもつ方がCTS生成にはよいことがわかった (25)。

Pinedex # 100 (澱粉部分分解物；加水分解率1.5%)を基質に

Pinedex#100 (partial hydrolyzate of starch, 1.3%-hydrolysis) were the following: substrate concentration, 3%; pH, 6-7; temperature, 30°C; enzyme dosages, 1 unit/g-dry solid 6GT, 10 units/g-dry solid IMT. In these optimum conditions the CTS yields reached 62% at the reaction time of 48 h (25).

E. Some Properties of CTS

The CTS crystals are accessible from a water solution (14,16,25). The crystal structure is determined by X-ray analysis (26). The asymmetric unit in the crystal contains one CTS together with five water molecules. One of the water molecules was found in the dish-shape cavity of CTS. CTS adopts a plate-like overall shape with a very shallow depression on one side. Accordingly CTS is considered not to have a hydrophobic cavity region to form inclusion compounds similarity to CDs and CD molecule. Recently, we found CTS anhydrous and monohydrate crystals besides pentahydrate crystals. We are also interested in these crystal structures.

The solubility of CTS pentahydrate crystals in water is relatively high (46.1g/100g water at 20°C) and the sweetness is 27% sucrose. CTS does not exhibit maillard reaction at all and is very stable under alkaline conditions because CTS is a nonreducing saccharide (27).

CTS is expected to offer strong resistance to hydrolysis by glycosidases from its structure. In our examination, CTS was finally hydrolyzed to isomaltose by IMT and isomalto-dextranase (EC 3.2.1.94) (The CTS hydrolytic activity of IMT is very weak.). There was a difference between the reaction specificity of the two enzymes. With isomalto-dextranase, an open-chain intermediate was detected in the reaction mixture, while with IMT, this saccharide was not detected. This was probably caused by a difference in the reaction rates of both enzymes on open-chain intermediate. This action pattern of alternanase on CTS is analogous to that of IMT (12). Other enzymes hydrolyzing α -1,6-glucosidic linkage in an endo-fashion, such as dextranase (EC 3.2.1.11), isoamylase (EC 3.2.1.68), pullulanase (EC 3.2.1.41) did not act on CTS at all (Nishimoto *et al.*, unpublished data). No hydrolysis of CTS was observed in an *in vitro* digestive test using salivary, artificial gastric juice, pancreatic amylases or small intestinal enzymes. CTS was not utilized by typical human intestinal bacteria. These facts indicate that CTS is to a high degree, an indigestive saccharide (27).

F. Enzymatic Synthesis of Branched-CTS Derivatives

Various derivatives of CDs, representative cyclic oligosaccharide, are synthesized by chemical and enzymatic modifications for additional functions. It is known that α -1,6-glycosyl branched α -CD is synthesized through the condensation of isoamylase and pullulanase to improve the solubility of α -CD (28,29,30).

Two kinds of branched CTS resisting glucoamylase and

用いた場合の最適条件は、基質濃度；3 %、pH 6-7、温度；30 °C、6GT；1 unit/g-DS、IMT；10 units/g-DS であった。48 時間反応後の CTS 生成率は 62 % にも達した(25)。

E. CTS の諸物性

CTS は、水溶液中で容易に結晶化する(14,16,25)。X線解析により、その結晶の立体構造が明らかになっている(26)。それによると、結晶中の CTS 分子は非対称で、5つの水分子を持っている。内、1分子の水は CTS の空洞の中に存在していた。そのため、全体として浅い窪みを持つプレート状の形をとっている。従って、CTS 結晶は CDs やシクロデキストランなどの他のグルコ環状オリゴ糖のように包接可能な空洞を持っているわけではないようである。最近、我々は上記 5 含水結晶の他に CTS 1 含水および無水結晶も存在することを確認した。これらの結晶構造にも興味を持たれる。

CTS 五含水結晶の水に対する溶解度は比較的高く(46.1g/100g, 20°C)、甘味度は砂糖の 27 % である。非還元性糖質であることから、メイラード反応は示さないし、アルカリ領域でも非常に安定である(27)。

CTS はその構造から推定されるように、グリコシダーゼに對して強い抵抗性を持つことが期待できる。我々が検討した限り、IMT やイソマルトデキストラナーゼ (EC 3.2.1.94) で最終的にイソマルトースにまで加水分解された (IMT の CTS 分解活性は非常に微弱である)。両酵素の反応特異性には相違点が認められた。イソマルトデキストラナーゼの場合、開環した中間体が検出されたが、IMT の場合、この中間体は見出せなかった。これは、両酵素の中間体に対する作用性が異なるためと考えられた。アルタナナーゼの CTS に対する作用様式は、IMT によく似ている(12)。その他、デキストラナーゼ (EC 3.2.1.11)、イソアミラーゼ (EC 3.2.1.68)、プルラナーゼ (EC 3.2.1.41) などの α -1,6 グルコシル結合をエンド型で加水分解する酵素は全く作用しなかった (西本ら、未報告)。唾液、人口胃酸、ブタすい臓アミラーゼやラット小腸粘膜酵素を用いたインビトロ消化性試験においても全く分解されず、代表的なヒト腸内細菌にも CTS は資化されなかった。このことから、CTS は非常に高度な難消化性オリゴ糖であることがわかる(27)。

F. 分岐 CTS 誘導体の酵素合成

環状化オリゴ糖の代表である CDs は、機能性を付加する目的で化学的および酵素的に修飾された様々な誘導体が合成されている。溶解度の向上のため、プルラナーゼの縮合反応で合成された α -1,6-グリコシル分岐 CD がよく知られている(28,29,30)。

6GT、IMT と澱粉からなる反応液中には CTS の他に、グル

Fig. 5. Structures of branched CTS derivatives synthesized enzymatically.

α -amylase were isolated in the reaction mixture containing of 6GT, IMT and starch (25). One is α -1,4-glucosyl branched CTS, *cyclo*{ $\rightarrow$ 6)- α -D-glcp-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-glcp-(1 $\rightarrow$ 6)-[α -D-glcp-(1 $\rightarrow$ 4)-] α -D-glcp-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-glcp-(1 $\rightarrow$)} (Fig.5). The other is α -1,3-isomaltosyl branched CTS, *cyclo*{ $\rightarrow$ 6)- α -D-glcp-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-glcp-(1 $\rightarrow$ 6)-[α -D-glcp-(1 $\rightarrow$ 6)- α -D-glcp-(1 $\rightarrow$ 3)]- α -D-glcp-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-glcp-(1 $\rightarrow$)} (Fig.5). These branched CTS are considered to be synthesized by transglycosylation of 6GT and IMT to CTS. On the other hand, Côté and Biely isolated α -1,6-glucosyl branched CTS (Fig.5) from the reaction mixture of alternanase and alternan (14). Such a branched CTS was not observed in the reaction mixture containing 6GT and IMT. This seems to be because there is a difference in enzymes and substrate used.

In addition, enzymatic synthesis of branched CTS is attempted actively. Côté *et al.* reported that α -1,6-galactosyl branched CTS (Fig.5) is mainly synthesized by using α -galactosidase from coffee bean and *Thermomyces lanuginosus* and melibiose as donor substrate (31).

コアミラーゼや α -アミラーゼに耐性の分岐 CTS が主に 2 種生成していた(25)。一つは α -1, 4-グルコシル分岐 CTS、*cyclo*{ $\rightarrow$ 6)- α -D-glcp-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-glcp-(1 $\rightarrow$ 6)-[α -D-glcp-(1 $\rightarrow$ 4)-] α -D-glcp-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-glcp-(1 $\rightarrow$)} (図 5)である。もう一つは α -1,3 イソマルトシル分岐 CTS、*cyclo*{ $\rightarrow$ 6)- α -D-glcp-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-glcp-(1 $\rightarrow$ 6)-[α -D-glcp-(1 $\rightarrow$ 6)- α -D-glcp-(1 $\rightarrow$ 3)]- α -D-glcp-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-glcp-(1 $\rightarrow$)} (図 5)である。これらのオリゴ糖は、6GT と IMT の転移作用により生成すると考えられている。一方、Côté と Biely はアルタナナーゼをアルタナンに作用させた反応液から α -1,6-グルコシル分岐 CTS (図 5) を単離した (14)。6GT と IMT の酵素系の場合、 α -1,6-グルコシル分岐 CTS は検出されなかった。両者の相違は、作用する酵素や基質の違いによるものと思われる。

その他、分岐 CTS の酵素合成が積極的に試みられている。Côté らは、メリビオースを供与体基質としてコーヒー豆および *Thermomyces lanuginosus* 由来 α -ガラクトシダーゼを作用させることにより、主生成物として α -1,6-ガラクトシル分岐 CTS (図 5) が生成することを報告した(31)。

G. Prospects

It is obvious that a starch-degradation pathway controlled by 6GT and IMT exists in *B. globisporus* C11. Indeed, during the culture of the strain using soluble starch as carbon source, CTS was synthesized with the decrease of starch in the medium and it was all consumed in time (Nishimoto *et al.*, unpublished data). This indicates that the strain synthesizes CTS to utilize starch. To clarify the whole starch-degradation pathway in *B. globisporus* C11, the structure of the gene cluster has to be investigated in further detail. The CTS gene cluster so far clarified is lacking in the genes encoding a part of the ABC transport system and a CTS-hydrolyzing enzyme.

Extended research is needed for the identification of other functions and applications of CTS. Equally the development of a mass-production method at a reasonable cost is of paramount importance.

Both 6GT and IMT are very attractive enzymes. The distinctive feature of 6GT is that it has a weak hydrolytic activity toward transfer products compared with α -glucosidase from *A. niger* using the manufacture of isomalto-oligosaccharides. It is possible that a new manufacturing process of isomalto-oligosaccharides could be achieved using 6GT instead of this α -glucosidase. IMT may be able to efficiently synthesize various transfer products having α -1,3-glucosidic linkage.

Only about ten years have passed since CTS was found. The study of CTS just begun now, however, and is progressing rapidly. By the time this review is published, new information on CTS will have already been discovered.

G. 今後の展望

6GT と IMT が関与した澱粉資化経路が *B. globisporus* C11 株に存在していることは明らかである。実際、可溶性澱粉を炭素源として本菌株を培養すると、澱粉の減少と共に培地中に CTS が生成し、やがてそれらが消費された (西本ら、未報告)。これは、本菌株が澱粉を利用するために CTS を生成していることを示している。この澱粉資化経路の全容を明らかにするためには、その遺伝子構造をさらに検討しなければならない。現在明らかになっている遺伝子クラスターには、ABC トランスポーター系の一部、および CTS 分解酵素に関する遺伝子が不足している。

CTS の機能性および用途を確認するためには、さらなる検討が必要である。それと共に、CTS を低価格で提供するため、その工業的製造法の開発も重要である。

6GT、IMT を個々にみた場合、とても魅力的な酵素である。6GT は、イソマルトオリゴ糖の製造に使用されている *Aspergillus niger* 由来の α -グルコシダーゼよりも転移生成物の分解活性が低いという特徴を持っている。この酵素の代わりに 6GT を使用することで、イソマルトオリゴ糖の新しい製造方法になる可能性がある。IMT は α -1,3-グルコシド結合を持つ種々の転移糖を効率よく合成できるかもしれない。

CTS が発見されてからおよそ 10 年しか経過していない。CTS の研究は今始まったばかりであるが、研究は急速に進行している。おそらく、本レビューが発表されるときには、すでに新しい情報が発信されているだろう。

References

- French, D. (1957) Adv. Carbohydr. Chem. **12**, 189–269
- Kawamura, M., and Uchiyama, T. (1989) Carbohydr. Res. **192**, 83–93
- Kawamura, M., and Uchiyama, T. (1993) Biosci. Biotech. Biochem. **57**, 343
- Kushibe, S., Mitsui, K., Yamagishi, M., Yamada, K., and Morimoto, Y. (1995) Biosci. Biotech. Biochem. **59**, 31–34
- Oguma, T., Horiuchi, T., and Kobayashi, M. (1993) Biosci. Biotech. Biochem. **57**, 1225–1227
- Oguma, T., Tobe, K., and Kobayashi, M. (1994) FEBS Lett., **345**, 135–138
- Seki, K., Haraguchi, K., Kishimoto, M., Kobayashi, S., and Kainuma, K. (1989) Agric. Biol. Chem. **53**, 2089–2094
- Ueda, M., Sashida, R., Morimoto, Y., and Ohkishi, H. (1994) Biosci. Biotech. Biochem. **58**, 574–575
- Oguma, T., Horiuchi, T., and Kobayashi, M. (1993) Biosci. Biotech. Biochem. **57**, 1225–1227
- Cramer, F. (1951) Chem. Ber., **84**, 851–854
- Kobayashi, M., Funane, K., and Oguma, T. (1995) Biosci. Biotech. Biochem. **59**, 1861–1865
- Côté, G. L., and Robyt, J. F. (1982) Carbohydr. Res. **101**, 57–74
- Biely P., Côté, G. L., and BURGESS-CASSLER, A. (1994) Eur. J. Biochem., **226**, 633–639
- Côté, G. L., and Biely P. (1994) Eur. J. Biochem. **226**, 641–648
- Côté, G. L., and Ahlgren, J. A. (2001) Carbohydr. Res. **332**, 373–379
- Nishimoto, T., Aga, H., Mukai, K., Hashimoto, T., Watanabe, H., Kubota, M., Fukuda, S., Kurimoto, M., and Tsujisaka, Y. (2002) Biosci. Biotech. Biochem. **66**, 1806–1818
- Aga, H., Maruta, K., Yamamoto, T., Kubota, M., Fukuda, S., Kurimoto, M., and Tsujisaka, Y. (2002) Biosci. Biotech. Biochem. **66**, 1057–1068
- Takami, H., Nakasone, K., Takaki, Y., Maeno, G., Sasaki, R., Masui, N., Fuji, F., Hiramata, C., Nakamura, Y., Ogasawara, N., Kuhara, S., and Horikoshi, K. (2000) Nucleic Acids Res. **28**, 4317–4331
- Hashimoto, Y., Yamamoto, T., Fujiwara, S., Takagi, M., and Imanaka, T. (2001) J. Bacteriol. **183**, 5050–5057
- Barnett, M. J., Fisher, R. F., Jones, T., Komp, C., Abola, A. P., Barloy-Hubler, F., Bowser, L., Capela, D., Galibert, F., Gouzy, J., Gurjal, M., Hong, A., Huizar, L., Hyman, R. W., Kahn, D., Kahn, M. L., Kalman, S., Keating, D. H., Palm, C., Reck, M. C., Surzycki, R., Wells, D. H., Yeh, K. -C., Davis, R. W., Federspiel, N. A., and Long, S. R. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **98**, 9883–9888
- Fiedler, G., Pajatsch, M., and Bock, A. (1996) J. Mol. Biol., **256**, 279–291

22. Nakada, T., Maruta, K., Tsusaki, K., Kubota, M., Chaen, H., Sugimoto, T., Kurimoto, M., and Tsujisaka, Y. (1995) *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 2210–2214
23. Nakada, T., Maruta, K., Mitsuzumi, H., Kubota, M., Chaen, H., Sugimoto, T., Kurimoto, M., and Tsujisaka, Y. (1995) *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 2215–2218
24. Oku, K., Sawatani, I., Sugimoto, S., Kanbe, M., Takeuchi, K., Murai, S., Kurose, M., Kubota, M., and Fukuda, S. (2002) *J. Appl. Glycosci.* **49**, 351–357 (in Japanese)
25. Aga, H., Higashiyama, T., Watanabe, H., Sonoda, T., Nishimoto, T., Kubota, M., Fukuda, S., Kurimoto, M., and Tsujisaka, Y. (2002) *J. Biosci. Bioeng.*, **94**, 336–342
26. Bradbrook, G. M., Gessler, K., Côté, G. L., Momany, F., Biely, P., Bordet, P., Perez, S., and Imberty, A. (2000) *Carbohydr. Res.*, **329**, 655–665
27. Shibuya, T., Oku, K., Sawatani, I., Kurose, M., Kubota, M., Fukuda, S., Kurimoto, M., and Tsujisaka, Y. (2002) Abstract book of annual meeting of Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, 4–2Ga09, Sendai, Japan
28. Abdullah, M., and French, D. (1970) **137**, 483
29. Shiraishi, T., Kusano, S., Tsumuraya, Y., and Sakano, Y. (1989) *Agric. Biol. Chem.* **53**, 2181–2188
30. Abe, J., Mizowaki, N., Hizukuri, S., Koizumi, K., and Utamura, T. (1986) *Carbohydr. Res.* **154**, 81–92
31. Biely, P., Puchart, V., and Côté, G. L. (2001) *Carbohydr. Res.*, **332**, 299–303

Received on September 14, 2002, accepted on October 7, 2002

Profile of the Authors

Tomoyuki Nishimoto is a research scientist of the Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc. He obtained his BSc and MSc degree from the Faculty of Agriculture, Osaka Prefecture University. He received his Ph.D. from that university in 1998 based on “Study of a novel enzyme converting maltose into trehalose.” His research interests are the finding of novel glycosidases having new EC number and enzymatic synthesis of available oligosaccharides using them. He enjoys playing tennis with his family every Saturday.