

平成 27 年度（2015）博士論文

*Bacillus circulans* G22-10 変異株による  $\alpha$ -グルカナーゼの生産と  
その精製および作用特異性に関する研究

実践女子大学大学院

生活科学研究科 食物栄養学専攻

荒木 紀美

# 目次

## I . 序論 ..... 7

1. 研究背景
  - (1) サイクロデキストリンとサイクロデキストラン
  - (2) サイクロデキストラン合成酵素
  - (3) 本酵素と反応性が類似するその他の酵素
2. 本研究の位置づけと目的

## II . 実験材料・方法 ..... 26

1. 菌株および酵素の調製
2. 各種測定法
  - (1) 還元糖量の測定 Somogyi-Nelson 法
  - (2) 全糖量の測定 フェノール硫酸法
  - (3) タンパク質量の定量法 Bradford 法
3. 酵素の作用特異性に関する予備的検討
  - (1) 培養液中の多糖の分析
  - (2) 粗酵素による反応生成物の調製と分画
  - (3) Sephacryl S-200 カラムによる酵素の部分精製と各種基質への作用
4. 電気泳動法 (Native-PAGE, SDS-PAGE)
5. 夾雑多糖との分離法
6. カラムクロマトグラフィーによる酵素の精製
  - (1) イオン交換カラムクロマトグラフィー  
DEAE-Toyopearl, CM-Toyopearl, DEAE-Sephadex , MCI-gel,  
QAE-Toyopearl,
  - (2) アフィニティーカラムクロマトグラフィー  
Sephadex G-25, SST-EP
  - (3) 疎水性カラムクロマトグラフィー  
Hexyl-Toyopearl
  - (4) Hydroxy Apatite カラムクロマトグラフィー
  - (5) ゲルろ過カラムクロマトグラフィー  
Toyopearl HW-55, Sephacryl S-200, Sephacryl S-500,  
Sephacryl S-500, Sepharose CL-2B

7. 酵素化学的性質の測定
  - (1) 最適作用 pH, pH 安定性
  - (2) 最適作用温度, 温度安定性
  - (3) 基質特異性の検討
  - (4) 重金属, 化学修飾試薬による阻害
8. 反応生成物の調製および分析
  - (1) 調製法, 分画および酵素分解法
  - (2) 高分子反応生成物の測定
    - 1) エタノール沈殿法
    - 2) 限外ろ過膜法
9. 薄層クロマトグラフィーによる分析
10. 高速液体クロマトグラフィーによる分析
11. NMR 分析

### III. 結果 ..... 39

1. G22-10 変異株による酵素の生産と調製
2. 酵素の作用特異性に関する予備的検討
  - (1) 培養液中の多糖および粗酵素による反応生成物の分析
  - (2) 酵素活性の分画
  - (3) 酵素の作用特異性
3. 酵素の多型と夾雑多糖の存在
4. カラムクロマトグラフィーによる酵素の精製法の検討
  - (1) イオン交換カラムクロマトグラフィー
  - (2) アフィニティーカラムクロマトグラフィー
  - (3) 疎水性カラムクロマトグラフィー
  - (4) Hydroxy Apatite カラムクロマトグラフィー
  - (5) ゲルろ過カラムクロマトグラフィー
5. 酵素の精製と純度検定
  - (1) G-22 変異株の酵素の精製
  - (2) 精製のまとめ
  - (3) 純度検定
6.  $\alpha$ -グルカナーゼの一般的な性質
  - (1) 最適作用 pH, pH 安定性
  - (2) 最適作用温度, 温度安定性
  - (3) 阻害剤による影響

7.  $\alpha$ -グルカナーゼの基質特異性の解析
  - (1) 各種基質への作用
  - (2) 基質特異性
  - (3)  $K_m$  および  $V_{max}$
8.  $\alpha$ -グルカナーゼの反応生成物の解析
  - (1) 反応生成物の分子量測定
  - (2) 酵素分解物の解析
  - (3) NMR 分析

IV. 考察 .....	145
V. 総括 .....	149
VI. 文献 .....	152
VII. 謝辞 .....	158

## 本文および図表中の略号

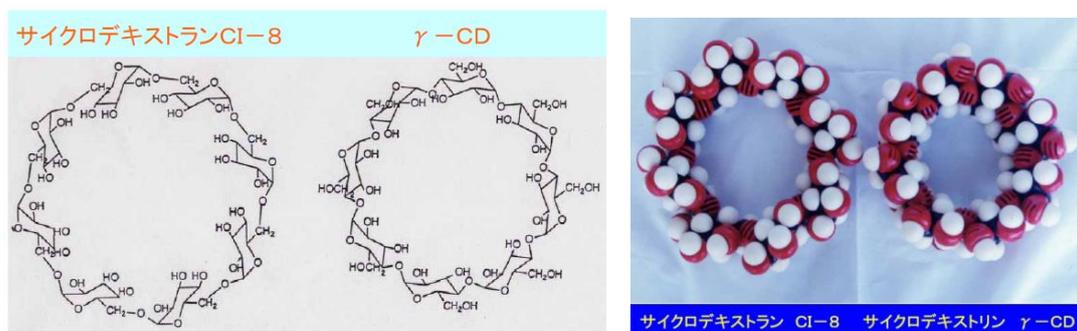
AmS…硫酸アンモニウム  
BL…blank(ブランク)  
CD…cyclodextrin(サイクロデキストリン)  
CI…cyclodextran(サイクロデキストラン)  
DN…dextranase(デキストラナーゼ)  
DX…dextran(デキストラン)  
E…enzyme(酵素)  
FG67(p)…日食フジオリゴ G67  
Glc(G)…Glucose  
GlcDN…グルコデキストラナーゼ  
IM2…イソマルトース  
IM3…イソマルトトリオース  
IM4…イソマルトテトラオース  
IM5…イソマストペンタオース  
IM6…イソマルトヘキサオース  
IM7…イソマルトヘプタオース  
IMs…イソマルトオリゴ糖類( $\alpha$ -1,6 結合型オリゴ糖)  
M2…マルトース  
M3…マルトトリオース  
M4…マルトテトラオース  
M5…マストペンタオース  
M6…マルトヘキサオース  
M7…マルトヘプタオース  
PAH…酸加水分解反応生成物  
PVP…ポリビニルピロリドン K90  
Rt…retention time(HPLC ピーク保持時間)  
SDX…dextrin(デキストリン)  
SST…soluble starch(可溶性デンプン)  
STD…標準マーカー, コントロール(スタンダード)  
isoA…イソアミラーゼ  
ppt…沈殿  
puLs…プルラナーゼ  
sup…上清  
 $\alpha$ -Amy… $\alpha$ -amylase( $\alpha$ -アミラーゼ)

# I . 序論

# 1. 研究背景

## (1) サイクロデキストリンとサイクロデキストラン

サイクロデキストリン (CD) は環状構造を持つ非還元性のマルトオリゴ糖の一種である。デンプン (SST) を基質として *Bacillus macerans* などの細菌から抽出されるサイクロデキストリン合成酵素, シクロマルト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) を作用させて生産される  $\alpha$ -1,4 結合からなる環状オリゴ糖で 6 分子以上のグルコースが結合している<sup>1)</sup>。グルコース単位が 6 個のものを  $\alpha$ -CD (シクロヘキサアミロース), 7 個のものを  $\beta$ -CD (シクロヘプタアミロース), 8 個のものを  $\gamma$ -CD (シクロオクタアミロース) と呼ぶ。1891 年に A. Villiers によって発見され, 1903 年に F. Schardinger によって環状構造が明らかにされた。CD は環状分子内に空洞を有しており, 空孔の内径は  $\alpha$  体が 0.45~0.6 nm,  $\beta$  体が 0.6~0.8 nm,  $\gamma$  体が 0.8~0.95 nm 程度とされている。その空洞の内側は疎水性を, 外側は親水性を示す性質があるため, 空洞径に応じて空洞内部に様々な物質をゲスト分子として取り込み, 安定化する作用を持つ。これを利用して, 疎水性の物質を包接して水に溶解させたり, 水や酸素と反応しやすい物質の保護や, 香りの維持, 異臭のマスキング, 乳化剤などとして家庭用品, 化粧品, 医薬品, 食品および飲料にいたるまで様々な利用されている。特に, 食品添加物としてわさびの辛味成分であるアリルイソチオシアネートを包接し, 辛味を長時間持続させる効果が知られており, また色素や水に難溶性の分子を包接する作用などが広く研究されている。これに対して,  $\alpha$ -1,6 結合からなる環状オリゴ糖はサイクロデキストランと呼ばれ新規な環状オリゴ糖であり, *Bacillus circulans* T-3040 株<sup>2)</sup> が生産するサイクロデキストラン合成酵素 (CITase, EC 2.4.1.248) によりデキストラン (DX) を基質として作られる<sup>2,3)</sup>。グルコース単位が 7 個のものを CI-7, 8 個を CI-8, 9 個を CI-9 とよぶ。CI と CD はよく似た性質を持つが, CI は CD よりも水溶性が高く, 抗う蝕能を始め多くの機能性を持つ環状オリゴ糖である<sup>4,5)</sup>。(序 図 1)



序 図 1. 環状オリゴ糖(CD, CI)モデル

最近、CD や CI などのサイクロオリゴ糖の包接反応に対する、界面活性剤や糖鎖修飾剤の作用性が検討され、ゲスト分子と糖鎖修飾剤が CD による包接効果を亢進し、CD、ゲスト分子、修飾剤の 3 者間の相互作用に増幅が生じる場合があることが確認された。修飾剤が包接作用を亢進する効果をもたらす、極めて興味深い結果が得られている。また、CD とカテキンの反応による複合体の分析も行われ、数種の複合体と見られる生成物も検出されている。また、CD および CI が脂肪酸を包接し、包接化合物を形成する反応性があることを踏まえて、不飽和脂肪酸のリノール酸を用い、CD、CI が酸化反応の進行を抑制する効果についても検討されている。CD は不飽和脂肪酸や酸化剤に対する包接作用があるため、酸化反応が起こりにくい状態を保持することで酸化を抑えるものと考えられており、また CI も色素包接作用があることから、CD と同様の機序で酸化反応の抑制をもたらすものと考えられている。

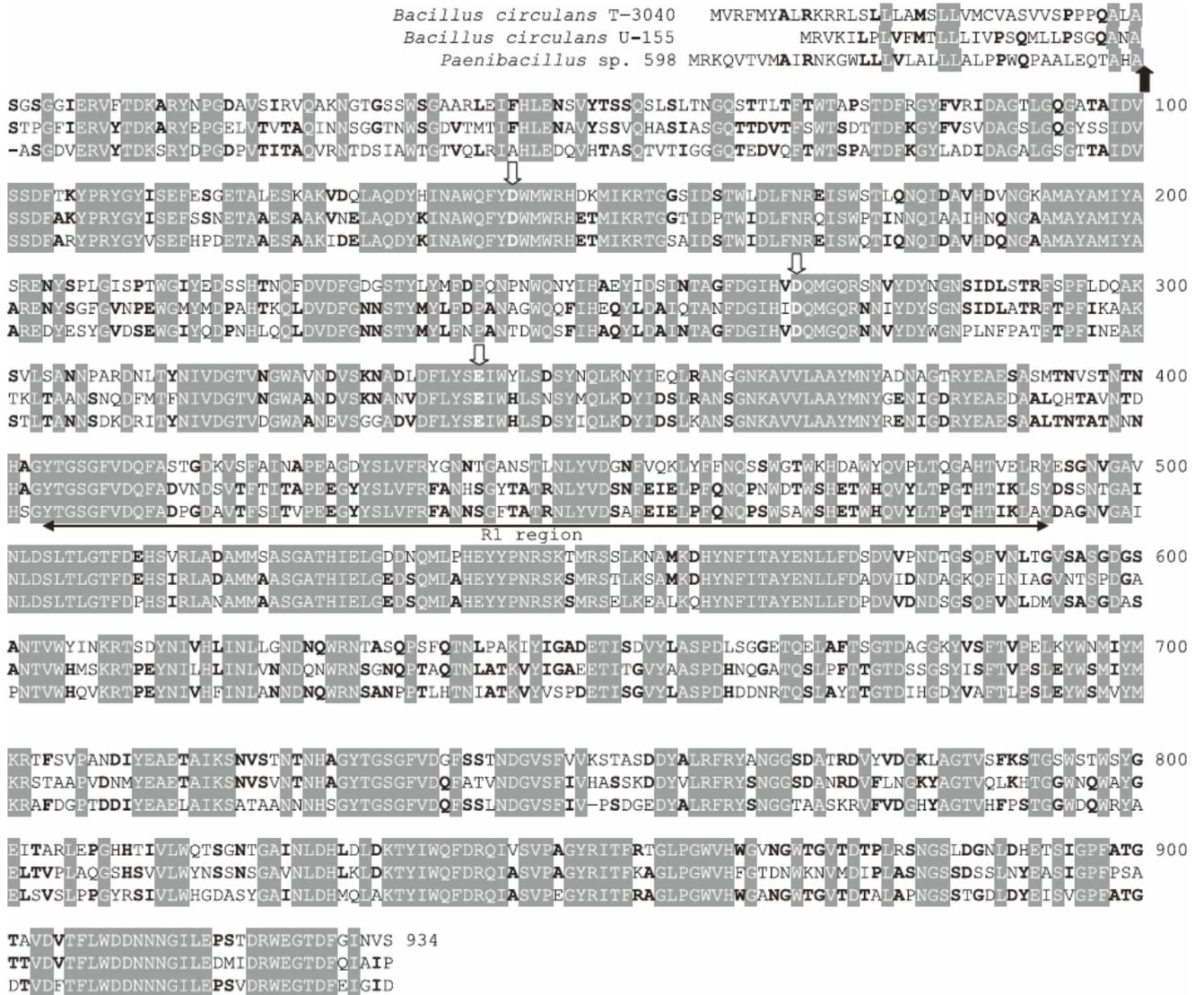
木村らは、デキストランを分解するエンドデキストラナーゼが CITase も含めて glycoside hydrolase (GH) ファミリー 66 に分類されること、これに属する酵素がタイプ I ~ III に分類されることを報告している<sup>6)</sup>。すなわち、エンドデキストラナーゼの中でイソマルトオリゴ糖の環状化反応を全く行わない酵素 (I)、弱い環化反応を行う酵素 (II) および、CITase のように強い環化反応を行う酵素 (III) の 3 種類である。通常のデキストラナーゼ<sup>7)</sup> は (I) に属するが、*Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 の酵素は (II) に属し<sup>6)</sup>、*Paenibacillus* sp. が生産する酵素も同様の作用を示すことが明らかにされた<sup>8)</sup>。

## (2) サイクロデキストラン合成酵素

サイクロデキストラン (CI) は  $\alpha$ -1,6 結合からなる新規な環状オリゴ糖であり, *Bacillus circulans* T-3040 株<sup>2)</sup> が生産するサイクロデキストラン合成酵素 (CITase, EC 2.4.1.248) によりデキストラン (DX) を基質として合成される<sup>2,3)</sup>。元々, デキストランは, サトウキビから砂糖を生産する工程で不要物として取り除かれていた。しかし, デキストランの使用法の研究が進むと, 血漿等の医薬品の原料として有用であることが示唆された。そのため, デキストランの大量生産が必要とされたが, 原料として用いられるものは砂糖のみであり, コスト高で効率的ではなかった。そこで, 原材料としてのコストが掛からずに, デンプンを基質としてデキストリンを大量生産できるようにするべく研究が始まった。1949年に Hehre が報告したデキストリンデキストラナーゼ(DDase, EC 2.4.1.2)は, 酢酸菌の *Acetobacter capsulatum* 由来であり, 分子量は SDS-PAGE で 300 kDa, 至適 pH は 4.0~4.2 であり, SST, 短鎖アミロース, マルトオリゴ糖 (G2~G6) を基質にして,  $\alpha$ -1,6 結合型の環状オリゴ糖を生産すると報告されている<sup>14)</sup>。 *Acetobacter capsulatum* 由来の DDase は, 菌対外に分泌され炭素源として不可欠なグルコース(5.45 %)とごく少量のデキストリン(0.05 %)の両方を含んでいる培養液中に存在する。この酵素については, 酵素化学的諸性質や精製法などが確立され, その構造解析もされている<sup>10,11,12,13)</sup>。

サイクロデキストランを産生する酵素はほかにもいくつか報告がある。*Paenibacillus* sp.由来の新規エンドデキストラナーゼは, 主にデキストランから 7-14 の重合度を有する環状イソマルトオリゴ糖 (CIS) と少量のイソマルトテトラオースを産生することが報告された<sup>8)</sup>。

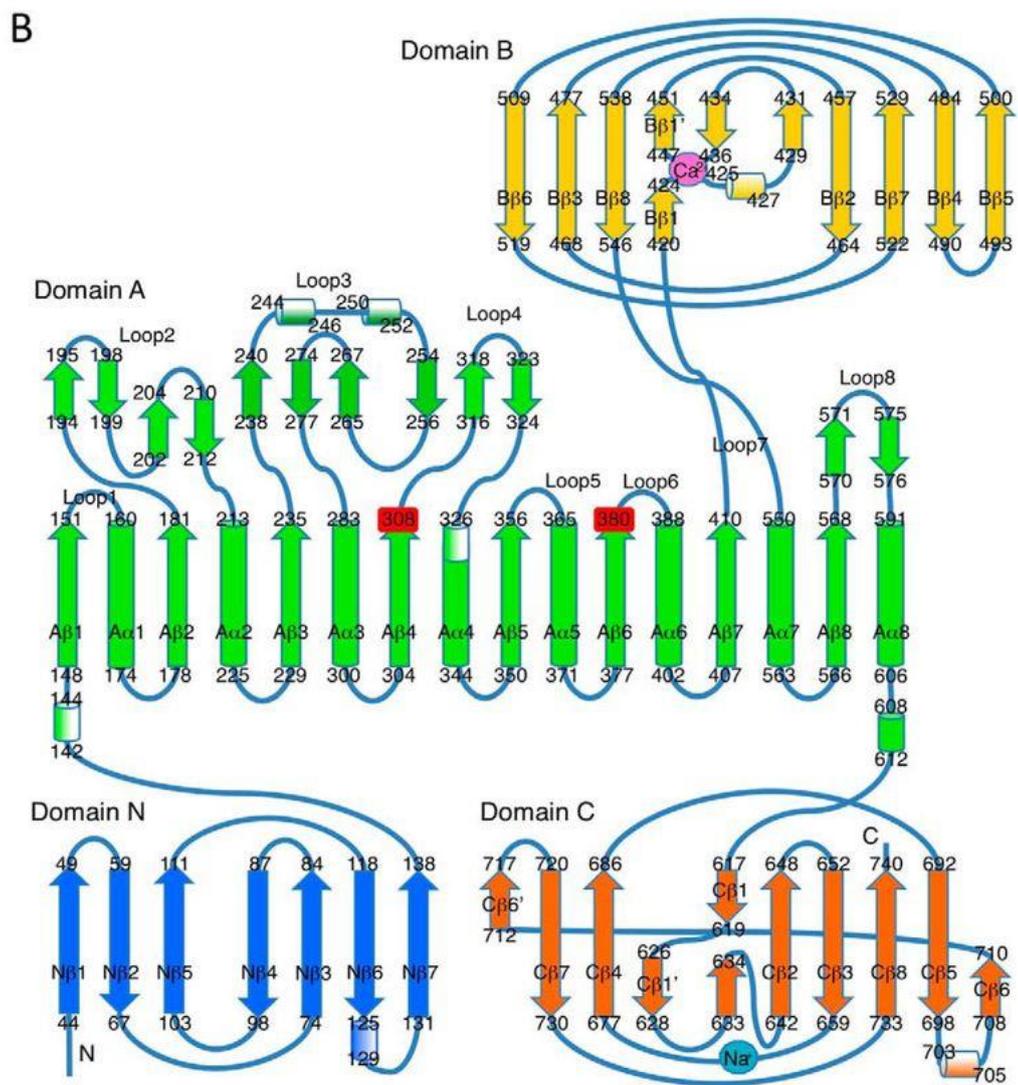
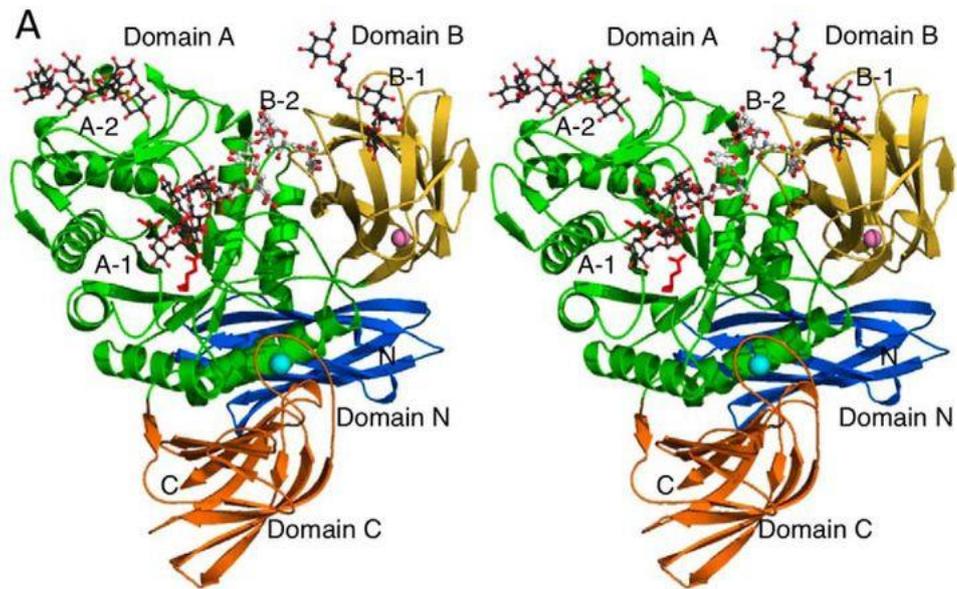
土壌中より分離された *Bacillus circulans* T-3040 株由来の CITase は, 分子量が SDS-PAGE で 98 kDa, 至適 pH は 5.5~7.0 であり, デキストリンを基質として,  $\alpha$ -1,6 結合型の環状オリゴ糖, 主に CI-7, CI-8, CI-9 を生産すると報告され, カップリング反応および不均化反応も観察された。これらの結果から, この酵素は分子内および分子間の糖転移を触媒する多機能酵素であることが示されている<sup>2,3)</sup>。この酵素は X 線解析の結果, その構造が明らかにされている<sup>14)</sup>。 *Bacillus circulans* U-155 から単離された CITase の, 主な生成物は環状オリゴ糖の CI-7 であり, 遺伝子は 2895-bp であることが報告されている<sup>15,16)</sup>(序 図 2~4)。



序 図 2. *Bacillus circulans* U-155, *Paenibacillus* sp. 598K, *B. circulans* T-3040 由来の CITase の塩基配列

Fig. 2 Alignment of the amino acid sequences of the CITases from *Bacillus circulans* U-155, *Paenibacillus* sp. 598K and *B. circulans* T-3040.

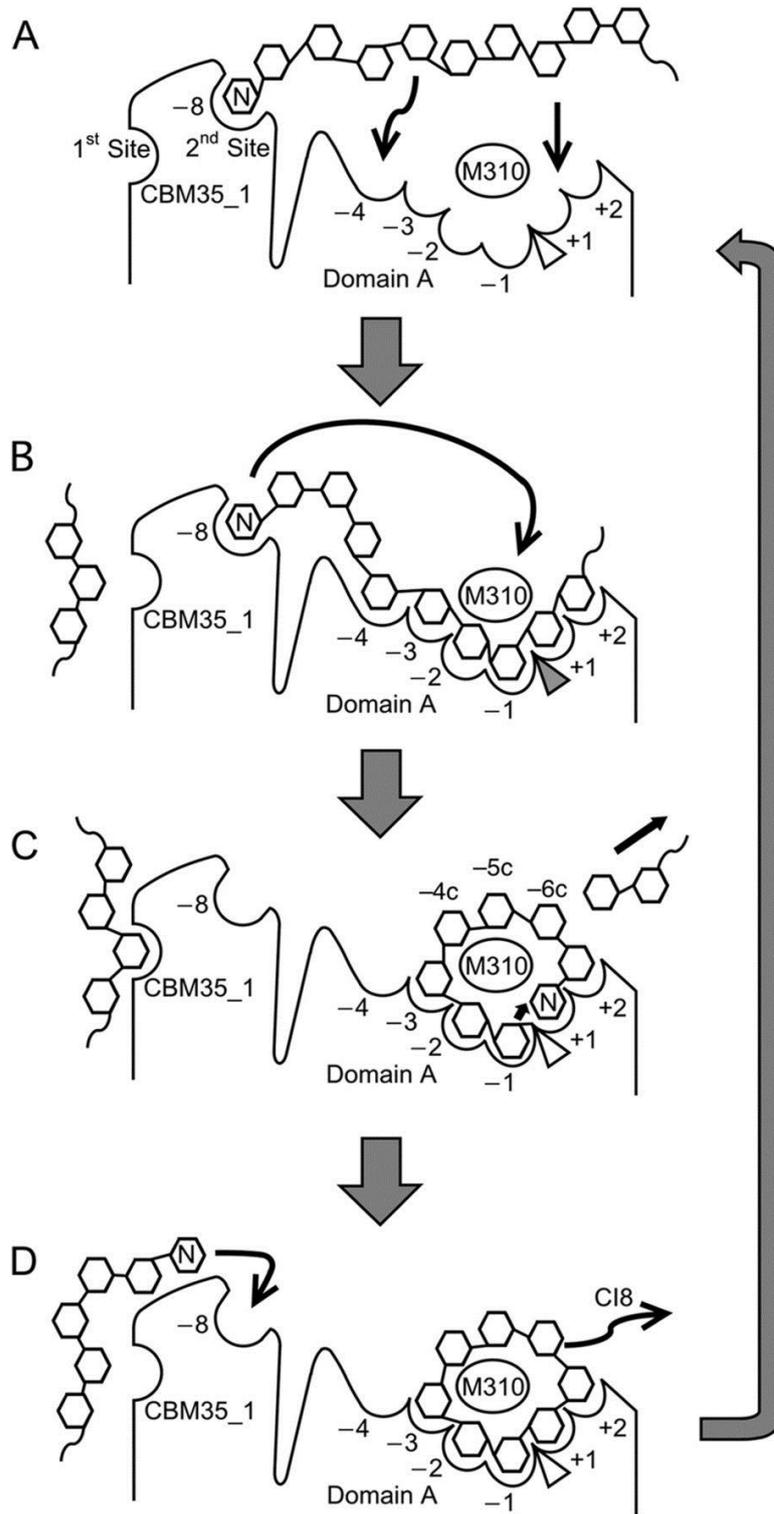
The primary amino acid sequence of the CITases were obtained from GenBank (IDs D88360 and D61382) for *B. circulans* U-155 and T-3040, and from DDBJ (ID AB685169) for *Paenibacillus* sp. 598K, respectively. The numbers begin from the N-terminal amino acid of the mature CITase. Amino acid residues that are identical between all CITases are indicated in gray. Amino acid residues that are identical between two CITases are shown as bold. The solid arrow shows cleavage sites for the signal peptidases. The open arrows show catalytic amino acid residues.



序 図 3. CITase の構造

Fig. 3 Structure of BcCITase.

A, stereoview of the BcCITase·CI-8 complex ribbon model. The model was drawn for chain B. IG-8 molecule bound in the catalytic site of chain B in the BcCITase·IG-8 complex was superimposed. Each domain is shown in different colors as follows: domains N, A, B, and C, are colored *blue*, *green*, *yellow*, and *orange*, respectively; two catalytic residues, *red*; bound CI-8 molecules, *gray*; superimposed IG-8 molecule, *white*; calcium ion, *pink*; sodium ion, *cyan*. Four sugar-binding sites are labeled as follows: catalytic site, *A-1*; the surface-binding site in domain A, *A-2*, canonical sugar-binding site in BcCBM35-1, *B-1*; the second sugar-binding site (subsite -8) in BcCBM35-1, *B-2*. B, topological diagram of BcCITase as follows:  $\alpha$ -helices,  $3_{10}$ -helices, and  $\beta$ -strands, as *filled cylinders*, *shaded cylinders*, and *filled arrows*, respectively. Catalytic residues, bound calcium, and sodium ions were placed.

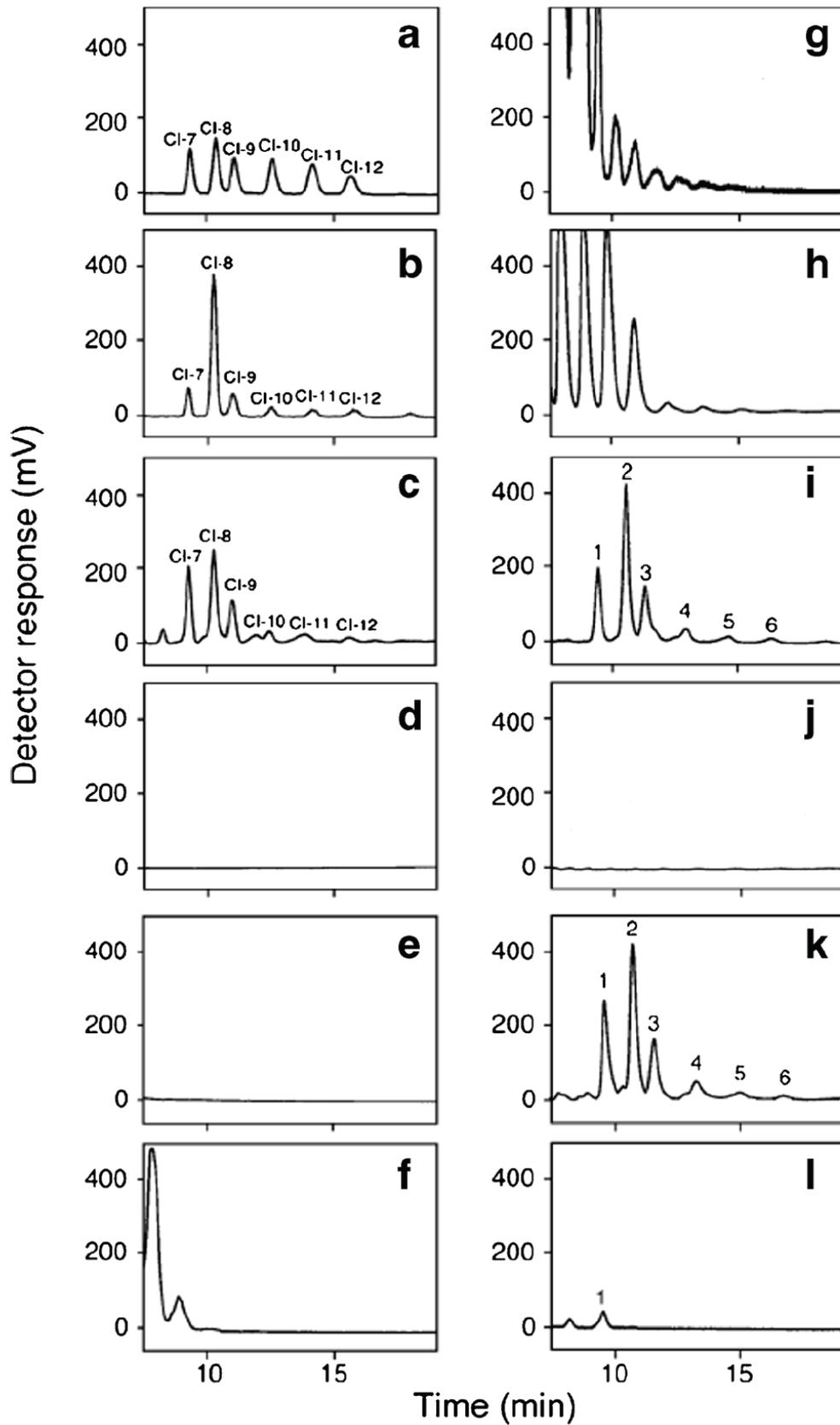


序 図 4. CITase の反応機構

Fig. 4 Schematic drawing of the CI-8-producing mechanism of BcCITase. A, substrate binding at the second sugar-binding site of BcCBM35-1. B, enzyme-substrate complex with eight glucose moieties occupied in the minus subsites. C, enzyme-substrate intermediate. D, enzyme-product complex. Incidentally, substrate recruitment at the conserved sugar-binding site is drawn.

環状イソマルトオリゴ糖である CI の機能性の特徴のひとつは、デキストランスクラーゼ活性を強固に阻害することである。この阻害はサイクロデキストランの濃度に依存し、30℃、30 分間の初期反応で増幅された。さらに、*Streptococcus mutans* 由来の糖転移酵素による、水に不溶性のグルカン（ムタン）合成は CI の付加により著しく抑制されるという報告がある<sup>4)</sup>。

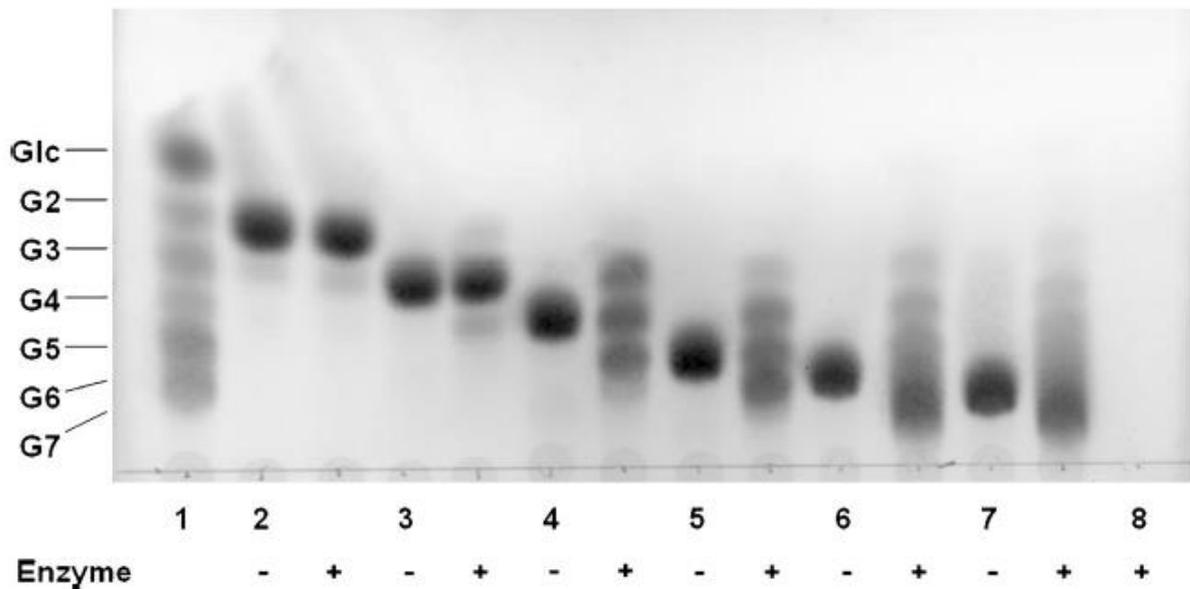
最近の研究で、舟根らは *B. circulans* T-3040 株から SST を基質にして CI を生産する酵素を新たに見出し報告した<sup>17)</sup>。この酵素は培養の炭素源により様々なオリゴ糖を生成する(序 図 5)。また、基質を加水分解して分子の再配列(デイスプロポーション)を行い、基質よりも分子量の大きいオリゴ糖を生成する反応を触媒することも分かっている(序 図 6)。また、一ノ瀬・舟根らは *Paenibacillus* sp. 598K 由来のデキストラングルカナーゼについても澱粉やマルトオリゴ糖からイソマルトオリゴ糖を生成し、同菌の CITase の作用を受けて CI に変換されることを報告している<sup>18)</sup>。*B. circulans* T3040 由来の CITase の主な生成物が cycloisomaltooctaose (CI-8) であったのに対し、*Paenibacillus* sp. 598K 由来の CITase による主な生成物は cycloisomaltoheptaose (CI-7) であった(序 表 1, 序 図 7)。このように一連の糖転移作用の高い酵素が *Paenibacillus* sp. に属する菌株により生産されることが次々と明らかにされている。



序 図 5. 様々な炭素源で生育した *B.circulans* T-3040 により生産されたオリゴ糖の HPLC 分析

Fig. 5 HPLC analysis of oligosaccharides produced by *B. circulans* T-3040 grown in media containing various carbon sources.

Appropriate amounts of oligosaccharides from the following samples were analyzed by HPLC, as described in the “Materials and methods” section. a The standards CI-7 to CI-12. Culture supernatants (4 days of cultivation) of *B. circulans* T-3040 grown in carbon source-supplemented LB broth (pH 8.0) (described in the “Materials and methods” section) with b 2 % dextran 40; c 2 % dextran 40 and 1 % glucose; d 2 % glucose; e 2 % sucrose; f 2 % isomaltose, isomaltotriose, and panose (IMOs); g 2 % FujioligoG67; h 2 % dextrin; i 2 % soluble starch; and j 2 % soluble starch and 1 % glucose. The culture supernatant of the medium containing soluble starch i was subsequently treated with k  $\alpha$ -amylase, HBDase, and glucoamylase, or l dextranase L (Amano Enzyme Inc., Nagoya, Japan)



序 図 6. *B. circulans* T-3040 酵素の不均化反応(テ ィ ス プ ロ フ - シ ョ ネ シ ョ ン)

Fig. 6 Disproportionation activity of the *B. circulans* T-3040 enzyme.

Substrate (1%) was incubated with (+) or without (-) the enzyme fraction (Mono Q fraction described in the legend of Fig. 5) in Tris-malate buffer (pH 6.0) at 37 °C for 1 day. The products were examined by TLC using silica gel 60 F254 in a solvent system of 1-butanol:acetic acid:water, 2:1:1.

Lane 1, standards; lane 2, maltose (G2); lane 3, maltotriose (G3); lane 4, maltotetraose (G4); lane 5, maltopentaose (G5); lane 6, maltohexaose (G6); lane 7, maltoheptaose (G7); and lane 8, no substrate

序表 1. *Bacillus circulans* U-155, *Paenibacillus* sp. 598K and *Bacillus circulans* T-3040  
由来の CITase の特性比較

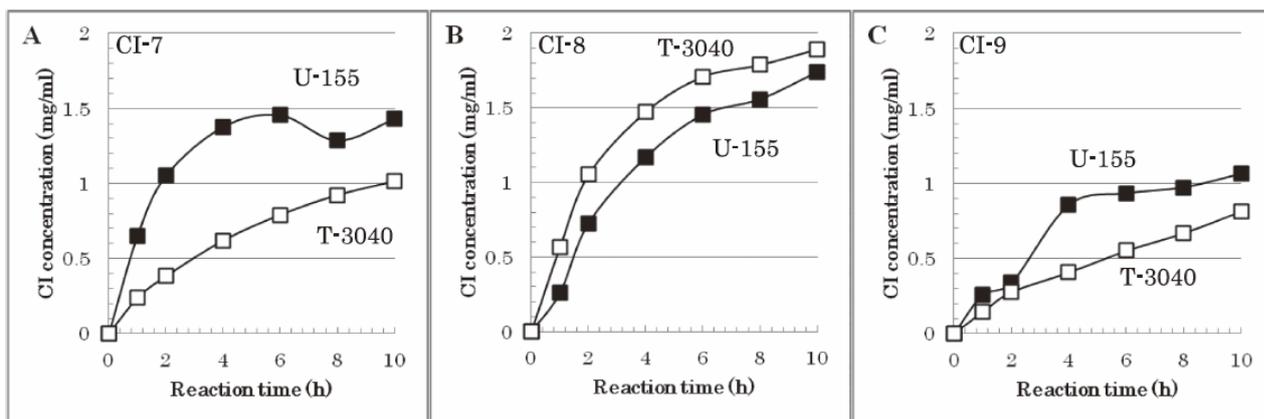
Property	<i>Bacillus circulans</i> U-155	<i>Paenibacillus</i> sp. 598K <sup>a)</sup>	<i>Bacillus circulans</i> T-3040 <sup>b)</sup>
Main product	CI-7	CI-7	CI-8
Optimum pH	6.0	5.5–8.0	5.5
Heat stability	50	50	40
Molecular weight <sup>c)</sup>	103930	103737	103275
Amino acid residue	934	932	934
N-terminal	Ser	Ala	Ser
Signal peptide size (residues)	30	40	38

Table. 1 Comparison of properties of CITases from *Bacillus circulans* U-155,  
*Paenibacillus* sp. 598K and *Bacillus circulans* T-3040.

<sup>a)</sup> The characteristics presented in the table were from literature and the molecular weight was calculated from the mature *Paenibacillus* sp. 598K CITase amino acid sequence information.

<sup>b)</sup> The characteristics presented in table were from literature and the molecular weight was calculated from the mature *Bacillus circulans* T-3040 CITase amino acid sequence information.

<sup>c)</sup> The molecular weight was calculated using amino acid sequence information of mature CITase from *Bacillus circulans* U-155.



序 図 7. *Bacillus circulans* U-155 and T-3040 由来の CITase の環化反応の経時変化

Fig. 7 Time course of cyclization reaction of CITases from *Bacillus circulans* U-155 and T-3040.

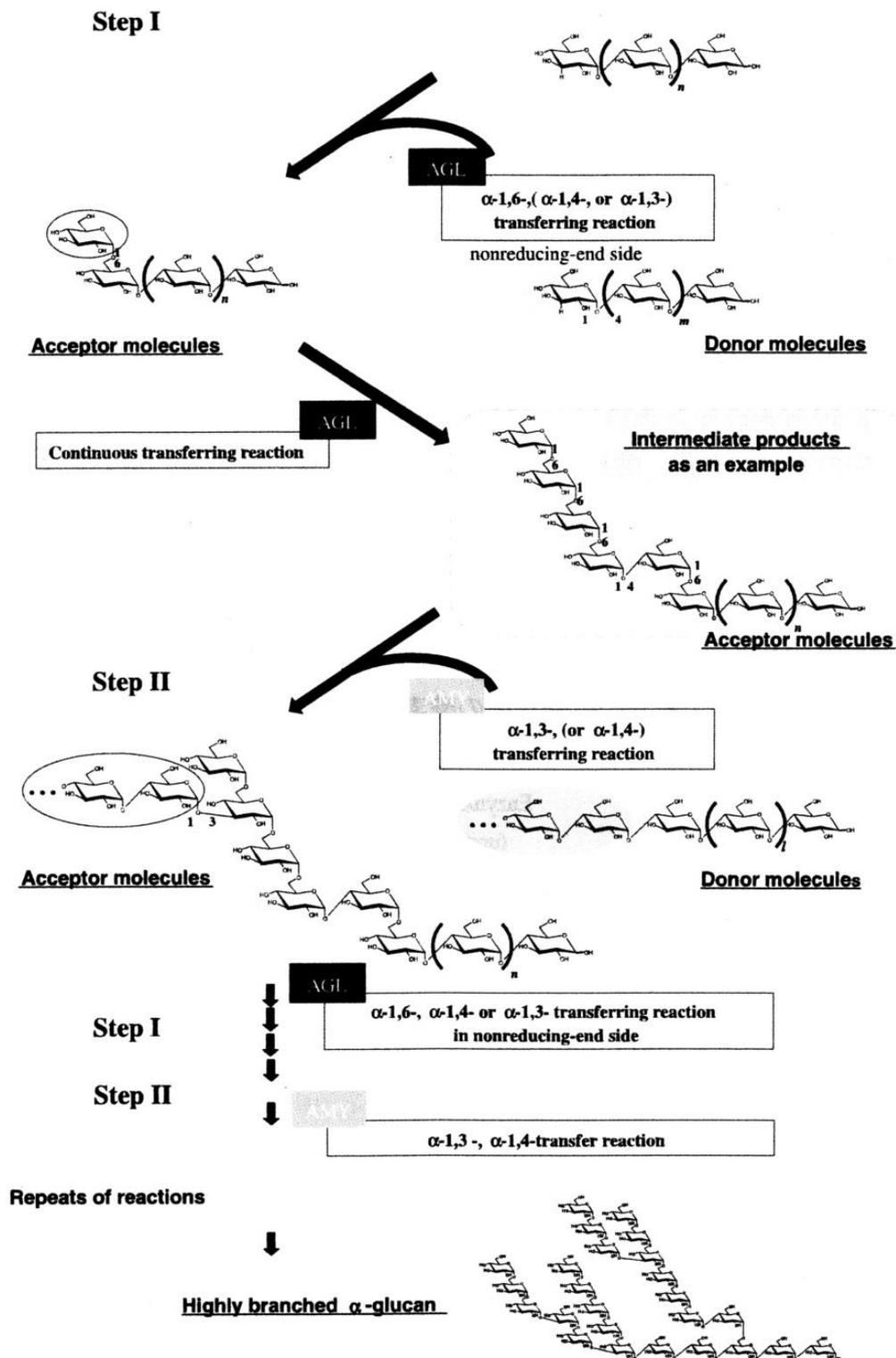
One milliliter of a 4.0% dextran-40 solution, 0.2 mL of 100 mM acetate buffer (pH 6.0 for *B. circulans* U-155-derived CITase and pH 5.5 for *B. circulans* T-3040-derived CITase), 0.78 mL distilled water and 0.02 mL of the respective CITases (2.71 U/mL) were mixed and incubated for 10 h at 40°C. One hundred-microliter aliquots of the reaction mixtures were withdrawn and boiled for 5 min. After centrifugation, the supernatants were analyzed by HPLC. (A) Time course of CI-7, (B) Time course of CI-8, (C) Time course of CI-9. Symbols: *B. circulans* U-155 (■), *B. circulans* T-3040 (□).

### (3) 本酵素と反応性が類似するその他の酵素

酵素には基質特異性があるため、一般の酵素は異なる2種の基質に同程度に作用することはまれである。単一の酵素が2種の異なる基質に作用する例としては、古くからそのような性質が広く知られているグルコアミラーゼがある<sup>19)</sup>。この酵素は $\alpha$ -1,4結合型基質である澱粉を分解してグルコースを生成するが、 $\alpha$ -1,6結合型基質のデキストランにも緩やかに作用してグルコースを生成するエキソ-デキストラナーゼに類似の作用を持つ<sup>20)</sup>。また、好アルカリ性細菌である *Bacillus* sp. KSM-1378 由来のアミロプurlラナーゼはプルラン中の $\alpha$ -1,6結合とその他の多糖に含まれている $\alpha$ -1,4結合を加水分解し、どちらの場合においてもアルカリ性 pH で最大活性になり、オリゴ糖を生成する活性を持つ<sup>21,22)</sup>。分子量は210 kDa であり、塩基配列やその構造も明らかにされている。この酵素の作用性は、両基質に対する加水分解活性がそれぞれふたつの独立した活性中心によるものだと示され、その形状はカスタネット様もしくはダンベル様になっていると推察され、その分子は直径およそ25 nm であるとされている<sup>21)</sup>。また、*Lactobacillus plantarum* L137 由来のアミロプurlラナーゼについての報告もあり、この酵素は澱粉を加水分解する $\alpha$ -アミラーゼ活性とプルランを分解するプurlラナーゼ活性を併せ持つとされ、分子量は215.6 kDa と報告されており、酵素化学的性質や、その塩基配列も決定されている<sup>23,24)</sup>。以上の、 $\alpha$ -1,4結合型基質と $\alpha$ -1,6結合型基質に対して作用する2種のアミロプurlラナーゼについては、その性質や精製法について報告がある。しかし、1996年にWynterらが報告している同様の活性を有する耐熱性デキストラナーゼおよびアミロデキストラナーゼについては、精製法など詳しいことは分かっていない。このアミロデキストラナーゼは、土壌中より採取、スクリーニングされた微生物が生産する、澱粉とデキストランの両方を加水分解する新規の酵素とされた<sup>25)</sup>。この酵素の分子量はおよそ140 kDa であり、至適温度は80 °C、至適 pH は pH 5.5 である。熱に対して非常に安定であり、75 °C で12時間処理しても活性は失活しなかった。この酵素は、ほぼ同じ触媒効率でデキストラン、澱粉、アミロース、およびアミロペクチンを加水分解するが、プルランは加水分解しない。このことから、アミロプurlラナーゼとは性質の異なる、類似した性質を持つアミロデキストラナーゼと定義付けられている<sup>26,27)</sup>。また、*Lipomyces starkeyi* KSM 22 の酵素では、アミラーゼ活性とデキストラナーゼ活性をもつ酵素が分子量100 kDa の単一のタンパク質として精製され、それぞれの酵素活性について精製後の比活性と全活性の割合がほぼ等しいことが報告されている<sup>28)</sup>。この酵素は SST や DX の他に $\alpha$ -1,3結合を含む、う蝕性細菌の *Streptococcus mutans* が生産するムタンを SST, DX と同レベルの90%近い加水分解率で分解することから、プラークの除去に有効であると述べられている<sup>29)</sup>。

高い糖転移反応性を示す酵素としては、最近、*Paenibacillus* sp.由来の $\alpha$ -グルコシ

ダーゼが  $\alpha$ -1,4 結合型基質のデキストリンに作用して  $\alpha$ -1,6 結合型の直鎖を作り, それの主鎖に  $\alpha$ -1,3 結合するとの報告がある<sup>30,31,32</sup>(序 図 8)。



序 図 8. マルトオリゴ糖から高枝鎖の  $\alpha$ -グルカン生産のための推定メカニズム

Fig.8 A Putative Mechanism for the Production of Highly Branched  $\alpha$ -Glucan from Maltooligosaccharide.

AGL transfers a glucosyl residue by  $\alpha$ -1,4- or  $\alpha$ -1,6-linkage at a nonreducing end of a glucosyl residue in an acceptor substrate (step I). AMY transfers a maltooligosaccharide by  $\alpha$ -1,3-glucosidic linkage to a 1,6-linked glucosyl residue and a nonreducing-end glucosyl residue in an intermediate product (step II).  $l, m, n$ , natural numbers.

## 2. 本研究の位置づけと目的

微生物が生産する環状オリゴ糖は、いずれも酵素作用により生成されている。従来は、生成される環状オリゴ糖の種類が限られており、また原料がコスト高で大量生産に向かない環状体が主だったが、 $\alpha$ -1,6 グルカンであるデキストランを材料として環状のイソマルトオリゴ糖を生産する菌株を検索し、*Bacillus circulance* T-3040 株を見出した<sup>2)</sup>。この菌株は主に CI-8 を生産し<sup>3)</sup>、グルコース 7~9 分子を、 $\alpha$ -1,6 結合で環状に連結させる作用を持つ。この酵素と、酵素が生成する環状オリゴ糖は新規に発見されたものであり、これまでにその性質が同定され X 線解析もされ構造が明らかにされている<sup>14)</sup>。最近、舟根らは親株から SST を基質にして CI を生産する酵素を新たに見出し報告した<sup>17)</sup>。また、一ノ瀬・舟根らは *Paenibacillus* sp. 598K 由来のデキストラングルカナーゼについても澱粉やマルトオリゴ糖からイソマルトオリゴ糖を生成し、同菌の CITase の作用を受けて CI に変換されることを報告している<sup>18)</sup>。これは、主に CI-7 を生産する酵素であるが、基質は  $\alpha$ -1,4 結合型、 $\alpha$ -1,6 結合型ともに作用する酵素である。さらに、*Paenibacillus* sp. が生産する酵素がマルトデキストリンから高分岐  $\alpha$ -グルカンを合成することが分かった。この菌は  $\alpha$ -グルコシダーゼと  $\alpha$ -アミラーゼの 2 種の酵素を持ち、両酵素の作用で主として  $\alpha$ -1,4 結合の直鎖構造と  $\alpha$ -1,6 結合の直鎖構造が連結された複雑な構造のグルカンを合成される。このように一連の糖転移作用の高い酵素が *Paenibacillus* sp. に属する菌株が生産されることが次々と明らかにされている。これまでも  $\alpha$ -1,4 結合型の基質に作用して  $\alpha$ -1,6 型の直鎖を作り、それが主鎖に  $\alpha$ -1,3 結合する作用を持つ  $\alpha$ -グルコシダーゼ<sup>30,32)</sup> や、 $\alpha$ -1,6 結合型の DX に作用してイソマルトテトラオースやその環状オリゴ糖を生成する新規の CITase など、*Paenibacillus* 由来の酵素でこのような転移作用をする酵素がいくつか報告されている<sup>18)</sup>。

このように多くの機能性を持つ CI の低コスト生産が利用のための課題となっており、CI 生産能を高めるために多くの変異株が育種された。本研究で用いた G22-10 株も、そのうちのひとつである。これは、*B. circulans* T-3040 株を NTG 処理して得られた変異株<sup>33)</sup> であり、CI 合成酵素活性を高めた変異株である。さらに、*B. circulans* T-3040 株にストレプトマイシン耐性を付与してタンパク質の合成を高めることにより CITase 生産性を高めた菌株であるため、変異に伴って他の酵素についても生産量が増加して検出が容易になっている可能性が高いと考えられる。そこで、親株の持つ酵素と変異株が持つ酵素との異同性を調査する目的で実験を始めた。はじめに、この G22-10 株が生産する糖質加水分解酵素について  $\alpha$ -1,4 結合と  $\alpha$ -1,6 結合を有する基質である SST や DX などの基質を用いて分解活性を調べたところ、G22-10 変異株の培養液を濃縮した粗酵素標品がこれらの基質を分解して還元糖を生成する活性を示すこと

を認めた。親株の CITase とは異なる作用を持つ酵素の存在が示唆されたことから、本論文では G22-10 変異株の酵素の作用性を検討し、精製法の確立を目指し、また酵素分子の多様性、および反応生成物の分析により糖転移反応性に関して検討した。

## II. 実験材料・方法

使用した菌株について

デキストラン (DX) からサイクロデキストラン (CI) を生成するサイクロデキストラン合成酵素 (CITase) の生産菌株 *B. circulans* T-3040 株を NTG(ニトロソグアニジン)処理で得られた G22-10 変異株を用いて研究を行った。この菌株は、農研機構 食品総合研究所の舟根和美博士より譲っていただいた。

#### 1. 菌株および酵素の調製

酵素液の大量調製のために、1 %ポリペプトン、0.5 %酵母エキス、1 %塩化ナトリウムおよび、炭素源として 2 %可溶性デンプン(SST), デキストリン(SDX, 以上和光純薬工業 (株), 大阪) およびデキストラン (DX, (MW 15,000~20,000, 名糖産業 (株), 名古屋)) を含む Luria-Bertani 培地 (pH 7.0) を調製し、120 °C で 15 分オートクレーブにて加圧滅菌した。前培養として試験管に 5 ml×4 本分注し、これに *Bacillus circulans* G22-10 変異株を植菌して 30 °C, 80~90 rpm で 3 日間振とう培養したものからもう一度、50 ml 容三角フラスコに 25 ml×4 個分注した培地に植菌し、再度同条件で前培養 (2 回目) を行った。これから 1 L 容三角フラスコに 250 ml×4 個分注した培地に新たに菌を植え継ぎ、同条件で 7 日間振とう培養した。培養液を高速冷却遠心分離(22,500 xg, 4 °C, 20 min)により上清と菌体を含む沈殿に分け、上清は 100 ml ずつ透析チューブに移し、ポリビニルピロリドン K90 (和光純薬工業 (株) 以降, PVP と表記) で濃縮後に冷凍保存した。

ジャーファーマンターによる大量培養は、同組成の液体培地 3 L をオートクレーブで加圧滅菌後、コンタミしないよう注意して前培養した培養液を 3 ml, 滅菌済みスポイトで植菌した。30 °C で 300 rpm, 通気量 1.5 L/ min で 3 日間培養した。その後、これまでと同様に高速冷却遠心分離後の上清を PVP で濃縮したものを冷凍保存した。

## 2. 各種測定法

酵素活性は、2%に調製した基質 SST または DX と酵素液を等量混合し 30 °C で 20 h 反応後に、生じた還元力を Somogyi-Nelson 法<sup>34)</sup>を用いて波長 500 nm (以下, A500 と表示) で測定した。この反応系で 1 min に 1  $\mu$  mol のグルコース相当の還元力を生成する酵素量を 1U とした。全糖量はフェノール硫酸法<sup>35)</sup>を用いて波長 490 nm (A490 と表示) で測定した。タンパク質量は 280 nm (A280 と表示) の吸光度測定、または Bradford 法<sup>36)</sup>にて測定した。

### (1) 還元糖量の測定 Somogyi-Nelson 法<sup>34)</sup>

試料 (酵素液) と基質を同量混合後、パラフィルムをして 30 °C の恒温水槽中にて overnight (20 時間) 反応させた。その後、1M NaOH を 100  $\mu$  l 加えてアルカリ失活、もしくは 100 °C で 5 分間ボイリングして酵素活性を失活させた。その後、試料の全量が 500  $\mu$  l になるように純水を加え、混合した後にアルカリ性銅試薬を 0.5 ml 入れ、100 °C の沸騰水中で 10 分間厳密にボイリングした。加熱処理後、水冷し、ネルソン試薬を 0.5 ml 加えて、泡が消えるまでよく混合した。色が安定するまで 15 分ほど放置し、再度混合してから純水を対象に 500 nm で吸光度を測定した。検量線を元に、測定した吸光度からグルコース量を求め、還元糖量とした。

### (2) 全糖量の測定 フェノール硫酸法<sup>35)</sup>

試料 0.5 ml, 5% フェノール 0.5 ml を混合後、濃硫酸 2.5 ml を加え、均一に混合した。放冷後、純水を blank として 490 nm で吸光度を測定した。検量線からグルコース量を求め、全糖量とした。

### (3) タンパク質量の定量法 Bradford 法<sup>36)</sup>

カラムフラクションなど液量があるものに関しては、280 nm で吸光度を測定した。カラムピークなど液量が少ないものに関しては Bradford 法のマイクロアッセイにより測定した。試料 0.8 ml に protein assay 試薬 (Bio-rad) を 200  $\mu$  l 加え混合し、5 min 放置後その 1 h 以内に、595 nm で吸光度を測定した。blank には純水を用いた反応液を調製し、測定の対象液として使用した。

### 3. 酵素の作用特異性に関する予備的検討

#### (1) 培養液中の多糖の分析

炭素源として SDX, DX を用いて本培養した粗酵素の上清にエタノールを加えて 90 % エタノール沈殿処理をした。4 °C 20 h 静置後遠心分離し低分子画分 (sup) と高分子画分 (ppt) に分け, ppt は純水 1 ml に溶解した。これを基質として 100  $\mu$ l ずつ試験管に採り, 0.1 %  $\alpha$ -アミラーゼ, デキストラナーゼ, グルコアミラーゼを 100  $\mu$ l 加え, 40 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.2) を 200  $\mu$ l 加え混合し, 30 °C の恒温水槽で 20 h 反応させ酵素分解をした。1M NaOH を 50  $\mu$ l 加え酵素活性を失活させ, 純水 50  $\mu$ l を加えて全量 500  $\mu$ l とした。この試料の還元糖量, 全糖量を測定後, HPLC 分析した。

#### (2) 粗酵素による反応生成物の調製と分画

反応生成物の調製は SST 培養した粗酵素の PVP 濃縮品 (1 本) を 40 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.2) で一晚透析後の遠沈上清 3 ml を, 2 % に調製した日食フジオリゴ G67 (以降 FG67 と表示, 日本食品化工 (株), 水溶液を Centricon Plus-20 (MILLIPORE, cut off MW 30,000) を用いて高分子画分を取り除いたもの 3 ml と混合し, 30 °C の恒温水槽中で 16 h 反応後, 100 °C で 5 min 加熱することにより酵素活性を失活した。

これに 1 % に調製した  $\alpha$ -アミラーゼ (50 mg / 5 ml 40 mM 酢酸緩衝液) を 0.6 ml 加えて混合し, 30 °C で 16 h 反応した。100 °C で 5 min 加熱により酵素活性を失活させ, 80 % EtOH となるようエタノールを加えて 4 °C で 1 h 静置した。

沈殿が少なかったため, さらに 20 ml のエタノールを加え, 再度 4 °C で 30 min 静置した。これを高速冷却遠心分離 (8000 rpm, 15 min) し sup #1 は別途保存した。ppt にエタノールを 20 ml 加え懸濁後, 常温で 16 h 静置した。エタノール懸濁液を卓上遠心分離 (3000 rpm, 15 min) にかけて, sup #2 は保存し, ppt を純水 3 ml に溶解後, エタノール 20 ml を加えて高速冷却遠心分離 (8000 rpm, 15 min) した。sup #3 にエタノールを 25 ml と 30 % CaCl<sub>2</sub> 0.5 ml を加え 4 °C 静置した。ppt は水 3 ml に溶解し, エタノールを 15 ml 加えて懸濁, 再度高速冷却遠心分離 (同条件) した。sup #4 は保存し, ppt は純水 2 ml に溶解後, エタノールを 15 ml 加えて 4 °C で 4 日間静置後, 30 % CaCl<sub>2</sub> 0.5 ml を加え混合し卓上遠心分離 (同条件) し, sup #5 は保存, ppt は純水 5 ml に溶解した。

調製した反応生成物の sup #1~5 と ppt について A490 測定し, 反応生成物の高分子画分として ppt を 1 %  $\alpha$ -アミラーゼおよびデキストラナーゼで分解し, A280, A500 の測定後 TLC, HPLC に供した。

### (3) Sephacryl S-200 カラムによる酵素の部分精製と各種基質への作用

粗酵素 (SST 培養) を Sephacryl S-200 で分画し, A280 および A500 を測定した。得られた活性画分のフラクションを回収し peak1 (#10~13), peak2 (#14~19) として PVP 濃縮した。

この2つの活性ピークを 1 ml の 20 mM Tris-HCl 緩衝液に溶解し, 基質として 1% マルトース (M2), マルトトリオース (M3), マルトテトラオース (M4), マルトペンタオース (M5), マルトヘキサオース (M6), マルトヘプタオース (M7),  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD, SST および DX を用いてそれぞれ 0.25 ml ずつ混合し 30 °C の恒温水槽中で 20 h 反応した。100 °C で 5 min 加熱し酵素活性を失活させ A500 測定後にロータリーエバポレーターで乾固するまで濃縮した。100  $\mu$ l の純水に溶かした試料を TLC および HPLC で分析した。

### 4. 電気泳動法 (Native PAGE, SDS-PAGE)

酵素タンパク質の分析にはポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) を用いた。泳動用スラブゲルプレートは 10% ポリアクリルアミドゲルを使用し, 泳動バッファーはトリス-グリシン緩衝液, または SDS トリス-グリシン緩衝液 (すべてコスモ・バイオ (株), 東京) 製を使用した。分析する試料とサンプル処理液を 1 対 1 の割合でサンプルチューブにて混合後, Native-PAGE はそのまま 15  $\mu$ l~20  $\mu$ l 供試し, SDS-PAGE は沸騰水中にて 5 分間ボイリング処理した後に供試し, 10~15 mA 一定, 室温で泳動した。Native-PAGE は Davis 法<sup>37)</sup>, SDS-PAGE は Laemmli 法<sup>38)</sup>を用いた。タンパク質分子量標準マーカーは, SHIMASHIMA-Ladder No.SS-3000 (コスモ・バイオ (株)), WIDE-VIEW III Code-230-02461 (和光純薬工業 (株)) を使用した。

酵素活性に共存する夾雑多糖の分解にはヒト由来の  $\alpha$ -アミラーゼ (23.5 U/ 100  $\mu$ l, SIGMA-ALDRICH ジャパン合同会社, 東京) を用いた。

ゲルの染色は CBB 試薬 (0.25% Coomassie Brilliant Blue R250, メタノール: 酢酸: 水 = 5: 1: 5) で 30 分間以上振とう後, 純水で洗浄してから活性炭とともに脱色液 (メタノール: 酢酸: 水 = 50: 75: 875) に浸して 20 時間浸透し, 目的のバンドを得た。銀染色は, Pierce Silver Stain Kit (Thermo scientific, U.S.A.) を使用した。

## 5. 夾雑多糖との分離法

PVP 濃縮した凍結粗酵素 1 本分を水で 4 °C, 16 時間透析処理し, 遠心分離後の上清 1 ml を酵素液として使用した。酵素に唾液由来の  $\alpha$ -アミラーゼ (0.1 %, 100  $\mu$ l) を混合し, 透析チューブに入れ, 水で 30 °C 一定の恒温機内で 3 h, 6 h, 24 h 透析処理した。各時間ごとに 250  $\mu$ l 採取し, 冷凍保存した。透析の外液も同様に 1.5 ml ずつ採取した。各サンプルについて, A280 測定 (10 倍希釈液), A490 測定, SDS-PAGE, Native-PAGE 分析を行った。SDS-PAGE に供するサンプルの前処理液として, 10 倍希釈した SDS-bufer (5 ml) に SDS 100 mg(2 %), メルカプトエタノール(10  $\mu$ l)を混合し, サンプル 100  $\mu$ l と処理液 100  $\mu$ l を混合後, 100 °C で 5 分間ボイリングしたものを 40 °C のオーブンで風乾濃縮した。完全に風乾したサンプルに SDS サンプル処理液 20  $\mu$ l と 67 %グリセリン 10  $\mu$ l を入れ, 溶解したものをサンプルとして, ゲルに供試した。電気泳動後, CBB 染色した後に, さらに銀染色を行った。Native-PAGE は, 染色用, 活性測定用に同一サンプルを 2 枚泳動し, 1 枚は CBB 染色後に銀染色, もう 1 枚は, 酵素の多形性の分析のために泳動したゲルをカッターナイフで 5 mm 間隔のさいの目状に切断し, SST, DX の各基質溶液 1 ml に浸漬してパラフィルムで封をしてから, 30 °C, 20 h 反応させ, 生じた還元力を Somogy-Nelson 法を用いて A500 で活性測定を行った。

## 6. カラムクロマトグラフィーによる酵素の精製

酵素の精製は 3~5°C で行った。

### (1) イオン交換カラムクロマトグラフィー

#### 1) DEAE-Toyopearl

活性処理した DEAE-Toyopearl (TOSOH(株), 東京) ゲルを  $\phi$  2.5 cm  $\times$  40 cm のカラムに充填し, 40 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.2) <sup>39)</sup> で洗浄後, 同緩衝液で 16 h 透析した凍結粗酵素(PVP チューブ 1 本分)の遠沈上清をカラムに供し, 4 ml/ 本で #1~25 までは 40 mM 酢酸緩衝液で溶出し, #26~60 までは 0 M~0.5 M NaCl でグラジエント溶出した。集めたフラクションについて, A280 でタンパク質量の測定, 基質 SST, DX を用いてそれぞれ活性の測定を行い, 活性ピーク画分については A490 測定も行った。

#### 2) CM-Toyopearl

活性処理した CM-Toyopearl (TOSOH(株), 東京) ゲルを  $\phi$  1.5 cm  $\times$  30 cm のカラムに充填し, 5 mM CaCl<sub>2</sub> を含む 40 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.2) で洗浄後,

PVP 濃縮した凍結粗酵素(SST 培養)の遠沈上清 3.5 ml をカラムに供し, 5 mM  $\text{CaCl}_2$  を含まない 40 mM 酢酸緩衝液で 0 M~0.5 M NaCl となるように 2 ml ずつ 60 本グラジエント溶出した。集めたフラクションについて, A280 でタンパク質量の測定, 基質 SST, DX を用いてそれぞれ活性の測定を行った。

### 3) DEAE-Sephadex

ゲルは Pharmacia のものを純水で膨潤させ洗浄した後  $\phi$  1.5 cm  $\times$  30 cm のカラムに充填して 5mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.75) で平衡化して使用した。酵素は SST 培養の PVP 濃縮品の透析上清を 8 ml 供試した。#1~45 は 0 M~0.25 M NaCl を含む 5 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.75) でグラジエント溶出し, #46~80 は食塩を含まない 5 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.75) を用いて 4 ml ずつ 80 本分画した。得られた分画液について, これまでと同様にタンパク質量, 活性測定を行った。

### 4) MCI-gel

純水で洗浄した MCI-gel 樹脂(三菱化学)を  $\phi$  1.5 cm  $\times$  30 cm のカラムに充填して 5 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.75) で平衡化して使用した。酵素は DX 培養の PVP 濃縮品を 5 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.75) で洗いこみ回収した 10 ml を供試した。0 M~0.4 M NaCl を含む 5 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.75) でグラジエント溶出し, 4 ml ずつ 60 本分画した。得られた分画液について, これまでと同様にタンパク質量, 活性測定を行った。

### 5) QAE-Toyopearl

粗酵素の精製の前処理として, まず粗酵素を少量の 0.2 M ホウ酸ナトリウム緩衝液で溶解し, 4 °C で 10 mM ホウ酸ナトリウム緩衝液(pH 8.3)をもちいて一晩透析した。遠心分離後の上清にヒト由来の  $\alpha$ -アミラーゼ (35.3 U/150  $\mu$ l) を混合し, 再度, 30 °C で 6 h 水を用いて透析処理を行い, 遠心分離後の上清をカラムに供した。QAE-Toyopearl (TOSOH (株), 東京) をカラム (2.5 cm  $\times$  40 cm) に充填し, 同 10 mM ホウ酸ナトリウム緩衝液で平衡化した。このカラムに試料を供し, 前半は同緩衝液で, 後半は 0 M~0.5 M 食塩のグラジエントで 6 ml ずつ 100 本を分画した。酵素活性とタンパク質を測定した後, 活性画分を回収し, Centricon Plus-20 (MILLIPORE, cut off MW 30,000, メルク (株), 東京) を用いて濃縮した。

## (2) アフィニティーカラムクロマトグラフィー

### 1) Sephadex-G-25

ゲルは Pharmacia のものを純水で膨潤させ洗浄した後  $\phi$  1.5 cm  $\times$  30 cm のカラムに充填して 2 M 硫酸アンモニウム (AmS) を含む 40 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.2) で平衡化して使用した。酵素は DX 培養の PVP 濃縮品の透析上清を 0.5 M AmS を含む 10 ml になるように調製したものを使用した。分画は #1~20 までは 0.5 M AmS を含む 40 mM 酢酸緩衝液を用い、#21~50 までは硫酸を含まない同緩衝液で 2 ml ずつ 50 本、ステップワイズ法で分画した。得られた分画液について、これまでと同様にタンパク質量、活性測定を行った。

### 2) SST-EP

SST をエピクロロヒドリンで架橋したゲルを調製した<sup>40)</sup>。ゲル 5 g を測り取り、乳鉢で細かく砕いたものを純水で洗浄し pH 5~6 にした。酵素は DX 培養の PVP 濃縮品を 2M AmS を含む全量 5 ml になるように 40 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.2) を用いて調製した。酵素とゲルを混合した後に平板シャーレに移し、4°C で 16 時間浸透した。このゲルをシリンジカラムに充填しフラクションコレクターを用いて #1~19 までは 2M AmS を含む 40 mM 酢酸緩衝液で、#20~50 は硫酸を含まない同緩衝液でステップワイズ法により 4 ml ずつ 50 本分画した。得られた分画液について、これまでと同様にタンパク質量、活性測定を行った。

## (3) 疎水性カラムクロマトグラフィー

### 1) Hexyl-Toyopearl カラム

ゲルは TOSOH のものを  $\phi$  1.5 cm  $\times$  30 cm のカラムに充填し、1M AmS を含む 40 mM 酢酸緩衝液で洗浄、平衡化した。酵素は DX 培養の PVP 濃縮品を 1M AmS を含む 2ml になるよう調製しカラムに供試し、#1~25 までは 1M AmS を含む 40 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.2) に最終濃度 5 mM 塩化カルシウムと 10 % グリセリンを加えたもの、#26~60 は硫酸を含まない同 40 mM 酢酸緩衝液で 2 ml ずつ 60 本ステップワイズ法で溶出した。得られた分画液について、これまでと同様にタンパク質量、活性測定を行った。

## (4) Hydroxy Apatite カラムクロマトグラフィー

ゲルは和光純薬 (株) のものを使用し  $\phi$  1.5 cm  $\times$  30cm のカラムに充填し 0.005 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8) で平衡化した。酵素は

DEAE-Toyopearl で部分精製した PVP 濃縮品を使用した。溶媒は 0.005 M～0.25 M 食塩を含むリン酸ナトリウム緩衝液で 2 ml ずつ 60 本をグラジエント溶出した。回収したフラクションのタンパク質量，および活性測定はこれまでと同様に行った。

(5) ゲルろ過カラムクロマトグラフィー

1) Toyopearl HW-55

純水で 3 回洗浄した Toyopearl HW-55 (TOSOH (株)) をカラム( $\phi$  1.5 cm $\times$  30 cm)に供し，純水で平衡化した。各種カラムクロマトグラフィーで回収した peak 画分を供試し，2 ml ずつ 50 本を純水で分画し，タンパク質量および全糖量を測定した。

2) Sephacryl S-200

各種カラムクロマトグラフィーで得られた活性画分を Sephacryl S-200 (Pharmacia, 東京) カラム( $\phi$  1.5 cm $\times$  30 cm)に供し，40 mM 酢酸緩衝液，pH 5.2 で 1 ml ずつ 50 本を分画した。酵素活性とタンパク質を測定した後，活性画分を回収し，先と同様の方法で濃縮した。

3) Sephacryl S-500

純水で 3 回洗浄した Sephacryl S-500 (日本 GE (株), 東京) をカラム( $\phi$  1.5 cm $\times$  30 cm)に供し，40 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.2) で平衡化した。先の DEAE-Toyopearl で回収した peak1 画分をカラムに供試し，0.6 ml ずつ 70 本を同緩衝液で分画し，タンパク質量および酵素活性を測定した。

4) Sepharose CL-2B

蒸留水で 3 回洗浄した Sepharose CL-2B (日本 GE (株), 東京) をカラム( $\phi$  1.5 cm $\times$  30 cm)に供し，20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した。先の CM-Toyopearl で回収した peak1 画分 1.8 ml をカラムに供し，2 ml ずつ 50 本を同緩衝液で分画し，タンパク質量および酵素活性を測定した。

## 7. 酵素化学的性質の測定

### (1) 最適作用 pH, pH 安定性

緩衝液はマッキルヴェイン緩衝液<sup>41)</sup>とリン酸緩衝液<sup>42)</sup>を用い、pH 2.2 から pH 10.8 の広範囲の酵素活性測定を行った。酵素 10  $\mu$ l, 基質として 2 % に調製した SST, DX 40  $\mu$ l, 各 pH になるように調整したマッキルヴェイン緩衝液, およびリン酸緩衝液を 200  $\mu$ l ずつそれぞれ混合し, 30°C の恒温水槽で 20 h 反応した。反応後 1M NaOH 250  $\mu$ l を加えて酵素反応をアルカリ失活し, 純水を 500  $\mu$ l 加えて全量で A500 を測定し活性最大残存値を 100% とし, 残存活性を求めた。安定性については, 酵素 10  $\mu$ l と各 pH に調製したそれぞれの緩衝液を 40  $\mu$ l ずつ混合し, 常温で 20 h 反応した。その後, 基質(2% SST, DX)を 200  $\mu$ l 加えて混合し, 30°C で 20 h 反応させ 0.1M NaOH 250  $\mu$ l で酵素をアルカリ失活させ、純水 500  $\mu$ l を加えて全量で A500 を測定した。活性最大残存値を 100% とし, 残存活性を求めた。

### (2) 最適作用温度, 温度安定性

15°C から 60°C までの各温度の水槽を用いて, 酵素活性測定を行った。pH 安定性と同様の手順で試料を調製し各温度で反応させた。温度安定性については, 活性最大残存値を 100% とし, 残存活性を求めた。

### (3) 基質特異性の検討

酵素は, 大量培養後 PVP で浸透膜濃縮し, 凍結保存していたものを透析し, 得られた上清を用いた。基質は  $\alpha$ -1,6 結合型の基質 7 種(重合度の異なる Dextran T-10(MW 10,000), T-20(MW 20,000), T-40(MW 40,000), T-70(MW 70,000), T-110(MW 110,000), T-500(MW 50,000), 常用の Dextran (MW 20,000)),  $\alpha$ -1,4 結合型の基質 13 種 (Soluble starch:4 種, 生化学用 可溶性デンプン (和光純薬), 一級試薬 可溶性デンプン (2 種) (どちらも和光純薬), マツノリン M-22 デンプン (松谷化学工業 (株)), dextrin:5 種, デキストリン水和物 (和光純薬), 同 (関東化学), デキストリン (コーン由来) (シグマ-アルドリッチ), 一級試薬 デキストリン (和光純薬), 同 (関東化学), アミロース A・B (ナカライテスク (株)), プルラン (和光純薬), FG67 (日本食品化工)) を用いた。2% に調製した基質 90  $\mu$ l と酵素 10  $\mu$ l を混合し, 30°C で一晩反応させた後, 生じた還元力を測定した。また, 基質として常用の 2% SST, DX, FG67 を用いて  $K_m$  値(mM), および  $V_{max}$  を測定した。

#### (4) 重金属, 化学修飾試薬による阻害

阻害剤として終濃度 1 mM に調製した 9 種の重金属, 化学修飾試薬を使用した。阻害剤を加えなかったもの (Blank) の活性の値を 100% として, 阻害剤を加えたときの値を残存活性 (%) で表した。

阻害剤 (終濃度 1mM) …硫酸銅 (CuSO<sub>4</sub>), 硫酸第一鉄 (FeSO<sub>4</sub>), 塩化第二鉄 (FeCl<sub>3</sub>), 硝酸コバルト (Co (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 硫酸マグネシウム (MgSO<sub>4</sub>), 塩化カルシウム (CaCl<sub>2</sub>), EDTA, ジチオトレイトール (DTT), ヨード酢酸

### 8. 反応生成物の調製および分析

#### (1) 調製法, 分画および酵素分解法

酵素作用による反応生成物の調製には, 基質として 2% に調製した SST, DX, マルトヘキサオース (M6), イソマルトヘキサオース (IM6) (以上, DX 以外は和光純薬工業 (株) 製),  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD (塩水港精糖 (株), 東京), CI-7, CI-8, CI-9 (野田産業科学研究所, 千葉, 小熊哲哉博士が調製したもの), または日食フジオリゴ G67 (以降 FG67 と表示, 日本食品化工 (株), 水溶液を Centricon Plus-20 (MILLIPORE, cut off MW30,000) を用いて高分子画分を取り除いたもの) を用いた。酵素は QAE-Toyopearl カラム分画で得られた酵素の活性画分の膜濃縮品を使用した。基質と酵素を 100  $\mu$ l ずつ混合し 30 °C で 20 h 反応させた後, 100°C, 5 min 保持で酵素活性を失活させたものを試料として還元糖量を測定 (A500) し, 反応生成物は TLC, HPLC 分析に供した。反応生成物のゲルろ過は Toyopearl HW-55 カラムにより行った。

また, Glucoamylase (pure) を用いて, 反応時間を経時的に変化させ高分子画分の分解率を求めた。さらに, 高分子画分について各種酵素による分解反応を行い, 分解率の測定後に HPLC により反応生成物の分析を行った。高分子画分の分解には  $\alpha$ -アミラーゼ, Glucoamylase, Dextranase (以上, 天野エンザイム (株)), Glucoamylase (pure; 生化学工業 (株)), pullulanase<sup>43</sup>, isoamylase<sup>44</sup> (SIGMA-ALDRICH) を使用した。

#### (2) 高分子反応生成物の測定

##### 1) エタノール沈殿法

2% に調製した FG67 および DX それぞれ 1 ml に対して, エタノール濃度が 50% (1 ml), 66% (2 ml), 75% (3 ml), 80% (4 ml), 86% (5 ml) となるようにエタノールを混合した。卓上遠心分離 (3,000 rpm, 10 min) し, sup と ppt に分

け、sup にもう一度エタノールを 1 ml 加えて卓上遠心分離した。先に得られた ppt を純水 0.5 ml で溶解し、sup, ppt についてそれぞれ全糖量(A490)を測定した。

## 2) 限外ろ過膜法

分子量の異なる 4 種のデキストラン、T-10(MW 10,000), T-20(MW 20,000), T-40(MW 40,000), T-70(MW 70,000)の 2 %溶液 50  $\mu$ l に純水 450  $\mu$ l を混合し、それぞれ Amicon Ultra-3k (MILLIPORE, cut off MW 3,000), Ultracent-10 (TOSOH, cut off MW MW 10,000), Ultracent-30 (TOSOH, cut off MW 30,000) の限外ろ過膜で処理した。高速遠心分離(8,000 rpm)で、試料が完全に落ちきるまで処理した。ろ液を回収し、再度フィルターに純水を 500  $\mu$ l 加えて高速遠心分離をした。これを 2 回繰り返す、それぞれ混合せずに保存した。得られたサンプルについて、全糖量(A490)を測定した。

## 9. 薄層クロマトグラフィーによる分析

シリカゲルプレート(20 cm $\times$ 20 cm)は 110 $^{\circ}$ C に設定した乾熱オーブンで活性化処理したものを使用し、溶媒は 70 % アセトニトリルを用いて上昇法により展開した。発色には p-アニスアルデヒド試薬を使用した。

## 10. 高速液体クロマトグラフィーによる分析

HPLC 分析に用いた分離カラムは TSK-GEL Amide-80,  $\phi$  4.6 $\times$ 250 mm (TOSOH (株)) を用い、装置は高速液体クロマトグラフ、検出器は RI 示差屈折計 (日本分光 (株), 東京) を使用した。試料はフィルター処理を行ったものを 10  $\mu$ l 供し、溶媒に 55 %アセトニトリルを用いて、カラム温度 25 $^{\circ}$ C, 流速 1 ml/ min で溶出した。

## 11. NMR 分析

NMR 分析には、先の方法 3. (1)に示したとおりに調製した反応生成物のエタノール沈殿処理試料の ppt #3~5 を用いた。各試験管に、洗浄後、ろう斗で脱水した DEAE-Toyopearl を 2 g 入れ、4 $^{\circ}$ C で 16 h 振とうした。その後、吸引ろ過によりろ液を回収した。純水でゲルを 2~3 回洗浄し、その洗液も回収し、ロータリーエバポレーターで乾固するまで濃縮した。濃縮した試料に重水 0.6 ml を

加え溶解し，終濃度 0.05 %になるように 1 % DSS 30  $\mu$ l を加え，混合したのち NMR 測定用のサンプルに移した。NMR 分析機器は Bruker AVANCE 500 Ultra Shield(ブルカー・ジャパン，横浜)を用いて行い， $^1\text{H}$  NMR， $^{13}\text{C}$  NMR，および二次元 NMR について，国立研究開発法人 農業・食品総合産業技術総合研究機構 食品総合研究所（茨城県）の舟根和美博士，小野裕嗣博士に依頼した。

### Ⅲ. 結果

## 1. G22-10 変異株による酵素の生産と調製

はじめに, *B. circulans* G22-10 変異株を 3 種類の炭素源を用いて培養し, 得られた培養液について, 遠心分離後の上清中のタンパク質, 酵素活性を測定した。その結果, 培養の炭素源の違いにより酵素生産量に差異が見られ, 酵素の誘導性に違いがあることが分かった。すなわち, 可溶性澱粉 (SST) 培養で酵素生産量が最も大きく, デキストラン (DX) 培養では SST よりはやや活性は弱かったものの, 両基質から還元糖を生産する割合は炭素源の違いに関わらず SST と DX に対する分解活性が約 1 対 1 の比率となった。つまり, どの炭素源を用いても活性測定用の基質である SST と DX に対する作用性の比率には大きな違いは見られず, 両基質に対して同程度に作用し還元力を生成する 2 つの酵素活性の存在が認められた (表 1)。

表 1 Enzyme activity of the culture supernatant of the G22-10 strain.

		Enzyme activity (U × 10 <sup>-4</sup> /mL)		Protein (mg/mL)
		Substrate SST	Substrate DX	A280
	SST	0.37	0.34	4.97
Carbon sources	SDX	0.23	0.33	15.32
	DX	0.10	0.12	3.84

The G22-10 strain was cultured with three different carbon sources, *i.e.* SST, SDX and DX. Assay of the enzyme activity was done with SST or DX as the substrate.

SST, Soluble starch; SDX, Dextrin; DX, Dextran.

## 2. 酵素の作用特異性に関する予備的検討

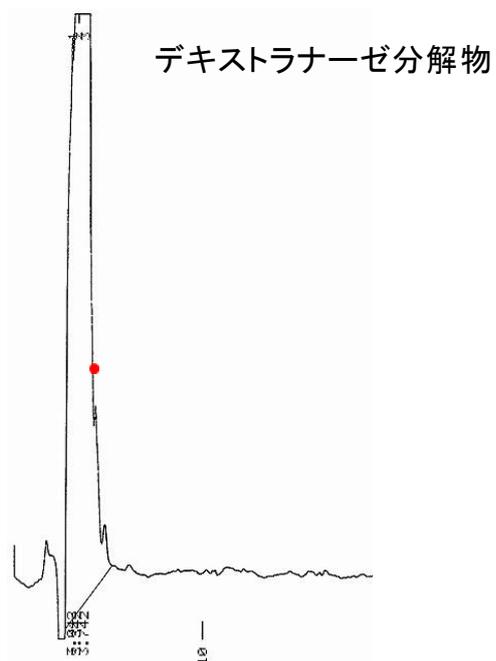
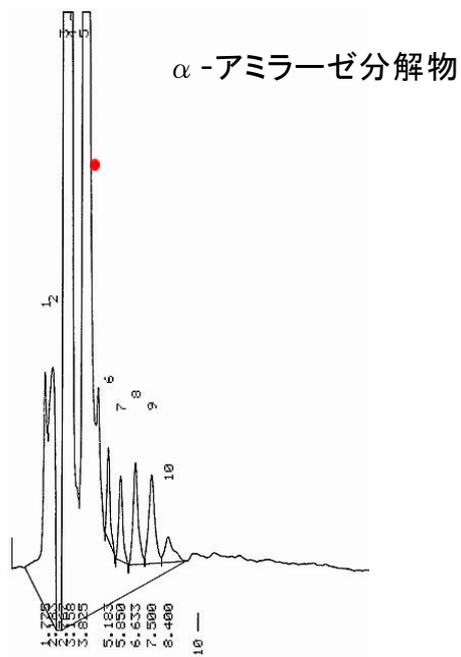
### (1) 培養液中の多糖および粗酵素による反応生成物の分析

粗酵素の培養液中に含まれるオリゴ糖画分と多糖画分についてその組成を分析した。

すなわち培養液の 90 %エタノール沈殿処理により得られた沈殿を多糖画分、上清をオリゴ糖画分として酵素分解し、HPLC により分析した。高分子画分については培養の炭素源や酵素による差が見られ、 $\alpha$ -1,4 結合型の SDX を炭素源に用いた培養液から得られた多糖画分は  $\alpha$ -アミラーゼで分解され、グルコースをはじめオリゴ糖のピークが多数見られたが、デキストラナーゼでも若干の分解を受け、グルコースのピークが検出された。また、 $\alpha$ -1,6 結合型の DX を炭素源に用いた培養液から得られた多糖画分でも同様にデキストラナーゼによる分解だけではなく  $\alpha$ -アミラーゼでも分解され、グルコースのピークが検出された (図 1)。これは、得られた高分子画分には培養の炭素源として用いた基質がある程度残っているために、その分解物としてのグルコースも算出された可能性が高いが、培養の炭素源として  $\alpha$ -1,4 型基質を用いた場合の高分子画分がデキストラナーゼで分解を受け、またその逆に培養の炭素源として  $\alpha$ -1,6 結合型基質を用いた場合の高分子画分も、少量ではあるが  $\alpha$ -アミラーゼで分解を受けてグルコースを産出していた。一方、低分子画分については CI の生成は明確ではなかったため、この酵素は親株である *Bacillus circulans* T-3040 株が生産する酵素とは異なる性質を持っている可能性が示唆された (図 2)。

SDX 培地  
(Dextrin)

●Glc



DX 培地  
(Dextran)

●Glc

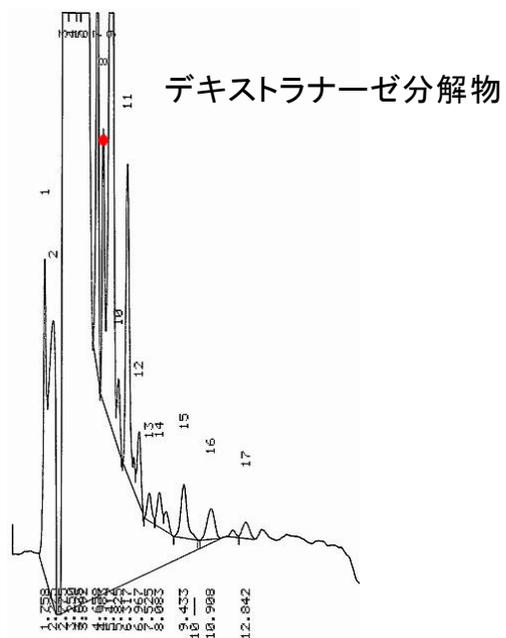
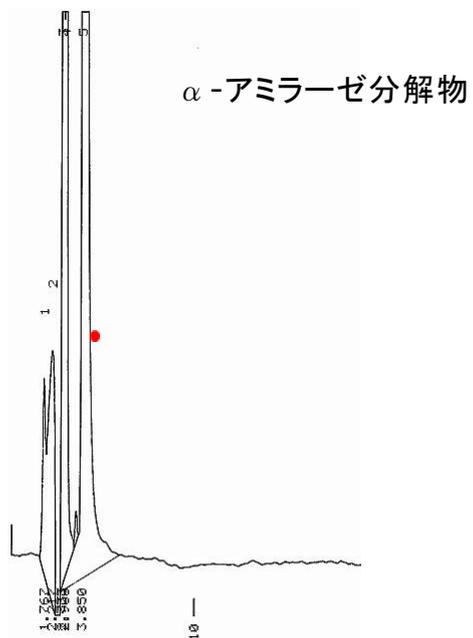


図 1. 培養液中の多糖の分析 (高分子画分の酵素分解)

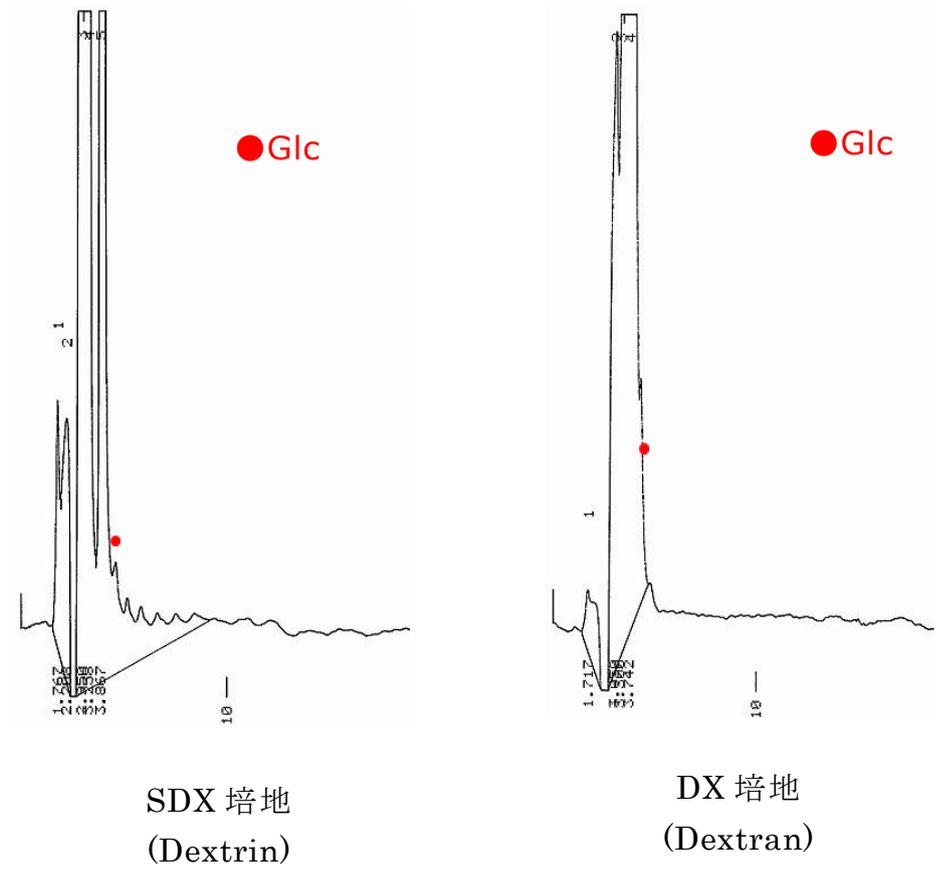


図 2. 培養液中のオリゴ糖画分（90% エタノール沈殿の上清）の HPLC 分析

次に、基質として 2% SST, DX, および FG67 を用いて反応生成物を調製した。基質と粗酵素を 20 h 反応後、エタノール沈殿法によりオリゴ糖画分と多糖画分に分け、多糖画分は酵素分解後 HPLC 分析に供した。オリゴ糖画分の HPLC 分析の結果、SST, DX 基質ともに基質の分解によるオリゴ糖のピークが検出された。HPLC の Rt から、SST, DX の低分子画分の反応生成物には、どちらもグルコース (Rt 4.5), マルトース (M2, Rt 4.9), マルトトリオース (M3, Rt 5.6) のピークが見られ、 $\alpha$ -1,6 結合型の基質である DX から生成された反応生成物のオリゴ糖画分に  $\alpha$ -1,4 結合型のマルトオリゴ糖と Rt が同じ糖が複数含まれていた。FG67p を基質に用いた場合は、標準糖 (STD) の FG67p (図 3, 右下) のチャートと比較するとこちらも同様にマルトオリゴ糖に対応するピークが検出された (図 3)。このことから本酵素は SST, FG67, DX すべての基質を加水分解し、低分子反応生成物として反応に用いた基質の種類に関わらず、 $\alpha$ -1,4 結合のオリゴ糖を生成したことが示された。

続いて反応生成物の高分子画分を各酵素分解して HPLC で分析した。 $\alpha$ -アミラーゼで分解した結果、基質の種類に関わらずすべての基質で STD で用いた FG67 とは異なるオリゴ糖のピークが多数得られ、 $\alpha$ -1,6 結合のイソマルトース系のオリゴ糖の Rt に相当していた (図 4)。この反応生成物はデキストラナーゼによる分解も受け、多量のオリゴ糖のピークが得られた (図 5)。

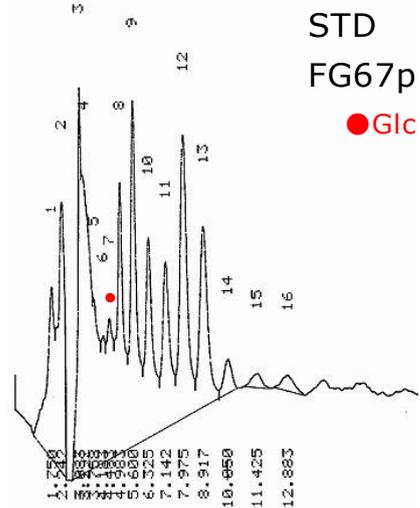
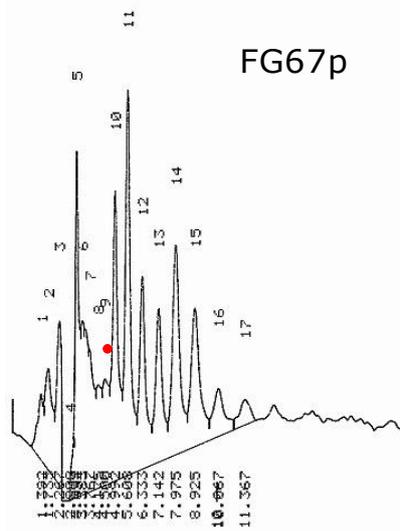
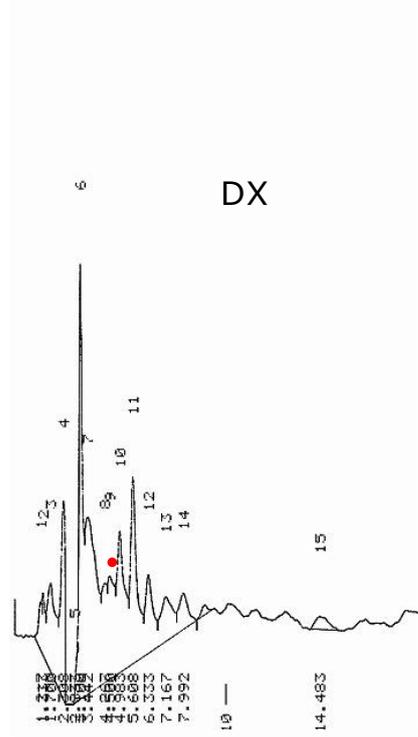
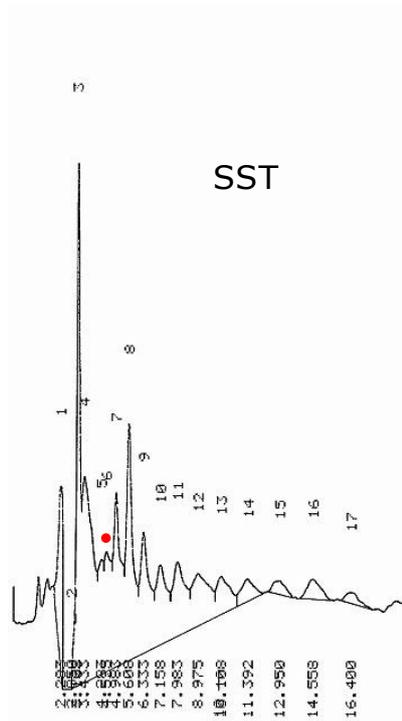


図 3. 反応生成物の低分子（オリゴ糖）画分の HPLC 分析

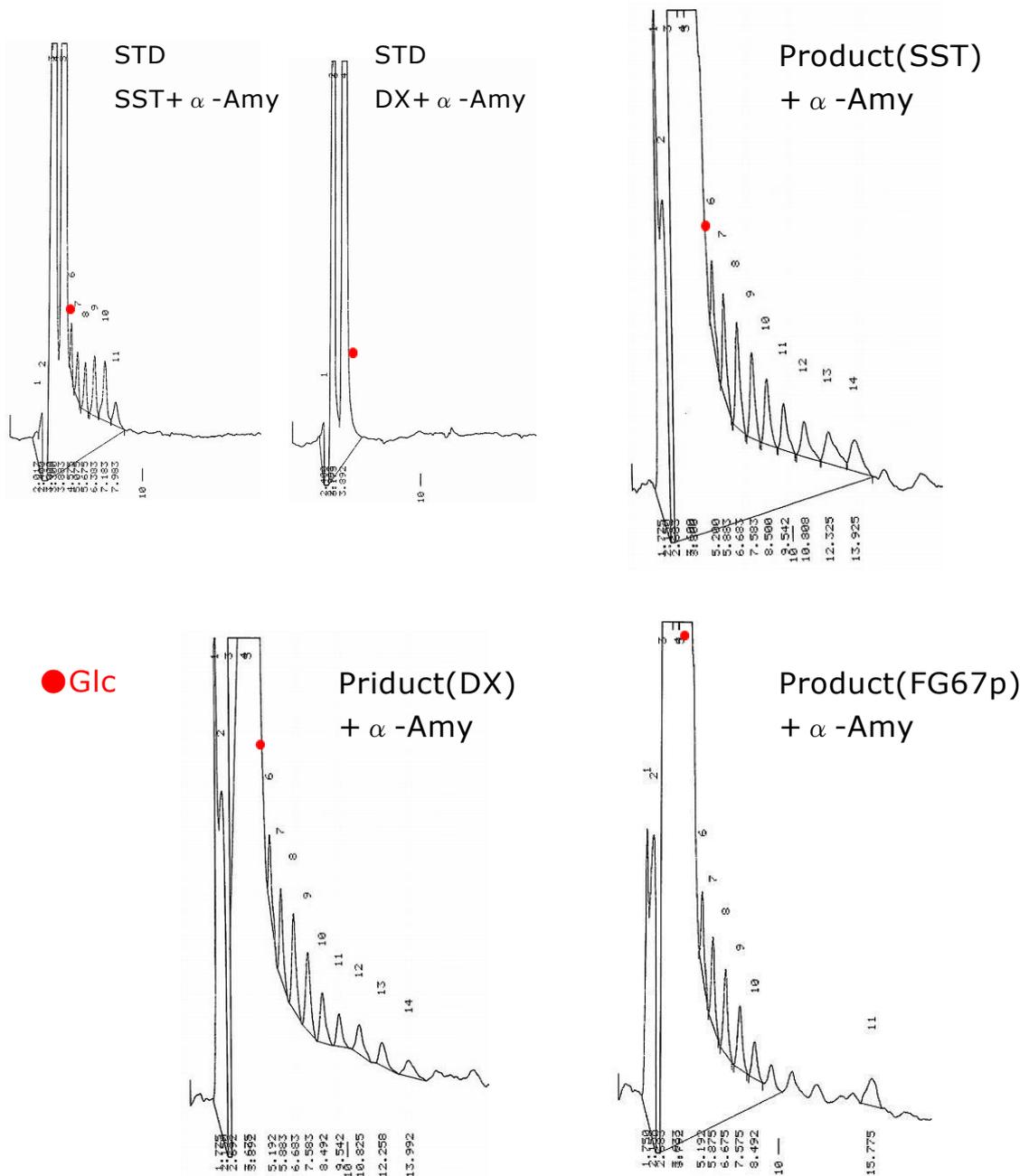


図4. 反応生成物の酵素分解 ( $\alpha$ -アミラーゼ) 後の HPLC 分析

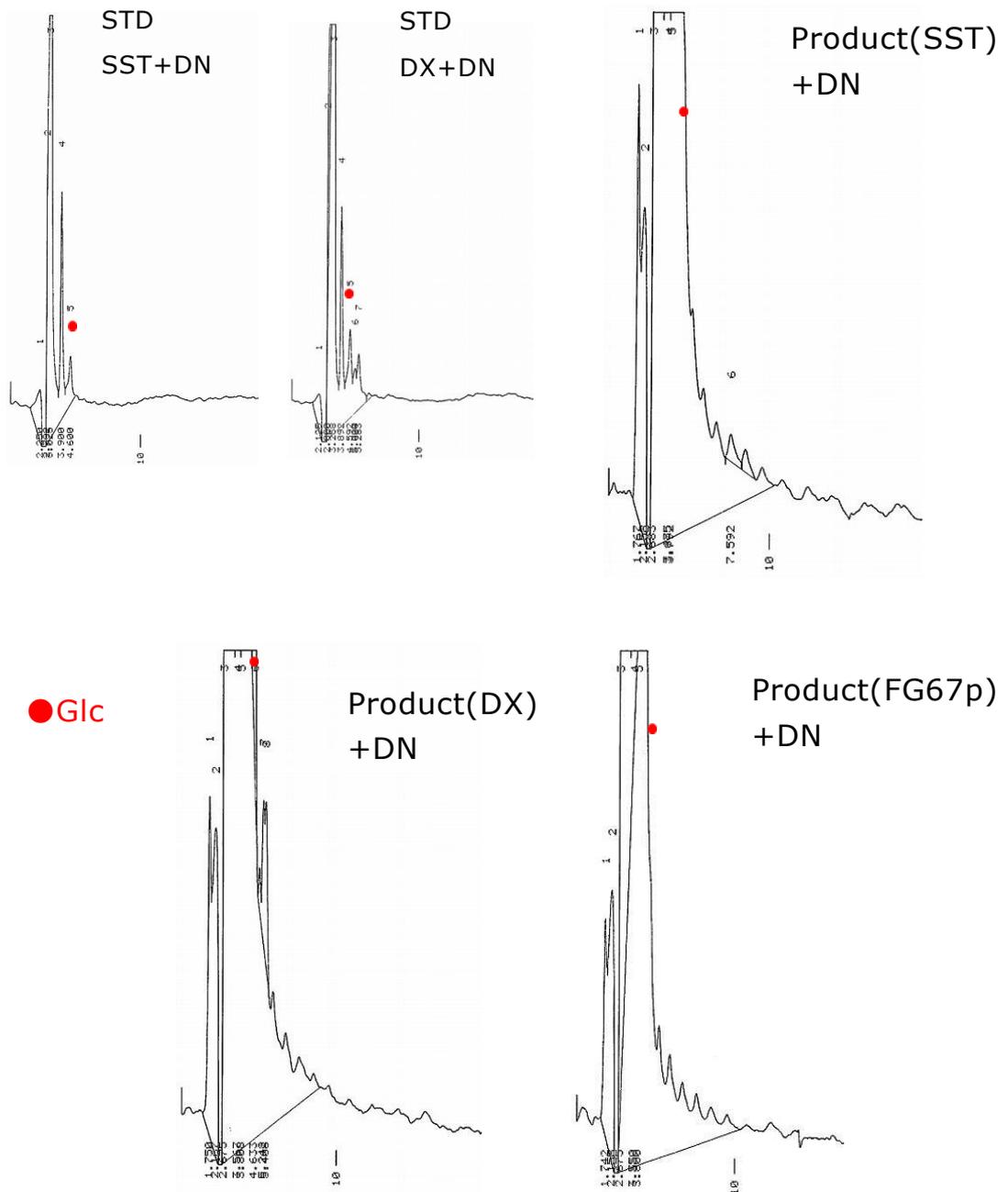


図 5. 反応生成物の酵素分解（デキストラナーゼ）後の HPLC 分析

これを踏まえて、1%に調製した6種の基質を用い、粗酵素の透析上清と沈澱画分の酵素を長時間作用させ反応生成物を分析した。24 h 反応では沈澱画分の酵素を 20 mM Tris-HCl 緩衝液に溶解したものをを用いて 30°C で反応させ、72h 反応では、酵素を 40 mM A.b に溶解し、8 mM 塩化カルシウムを添加し、40°C で反応した。HPLC の結果より 24 h 反応では、M3, M4 で基質の分解による低重合度のオリゴ糖とともに基質よりも高重合度の M7 などのピークが多数検出された。また、72 h 反応で、DX と SST のチャートが良く似ていたが、これは、酵素が  $\alpha$ -1,4 結合に作用し、さらに再配列が起きることによって、 $\alpha$ -1,6 結合含量の高いオリゴ糖を生成しているためと考えた(図 6)。

このことから、本酵素は  $\alpha$ -1,4 結合型、 $\alpha$ -1,6 結合型の3種類の基質に作用して、低分子画分の反応生成物は  $\alpha$ -1,4 結合のマルトオリゴ糖を多く含み、高分子画分の反応生成物は  $\alpha$ -1,6 結合を多く含むイソマルトオリゴ糖系に分子の再配列が起きていることが示唆された。

以上の結果から、本研究で用いた G-22-10 変異株の酵素は、親株である *B.circulans* T-3040 株の DX を基質として CI を産生する酵素と類似の性質を持つが、CITase 活性は低く、DX から生成する CI 量は少ないことが分かった。また、本酵素は  $\alpha$ -1,4 結合型基質、 $\alpha$ -1,6 結合型基質に共に作用し、これらの基質を加水分解してオリゴ糖を産生するとともに、産生したオリゴ糖分子を再配列する活性を持っていることが分かった。長時間反応した産生物の HPLC チャートがよく似ていることから、 $\alpha$ -1,4 結合型基質から得たオリゴ糖分子を  $\alpha$ -1,6 結合で再配列したり、またその逆に  $\alpha$ -1,6 結合型基質から得たオリゴ糖分子を  $\alpha$ -1,4 結合で再配列した可能性が示唆された。

このように、親株とは異なる性質を持ち、 $\alpha$ -1,4 結合型のデンプンと、 $\alpha$ -1,6 結合型のデキストランに、同程度に作用するという特性は、酵素の持つ基質特異性の面から見ても、珍しいことであるといえる。そこで、新規の研究材料としての可能性を見出し、精製と同定を行った。

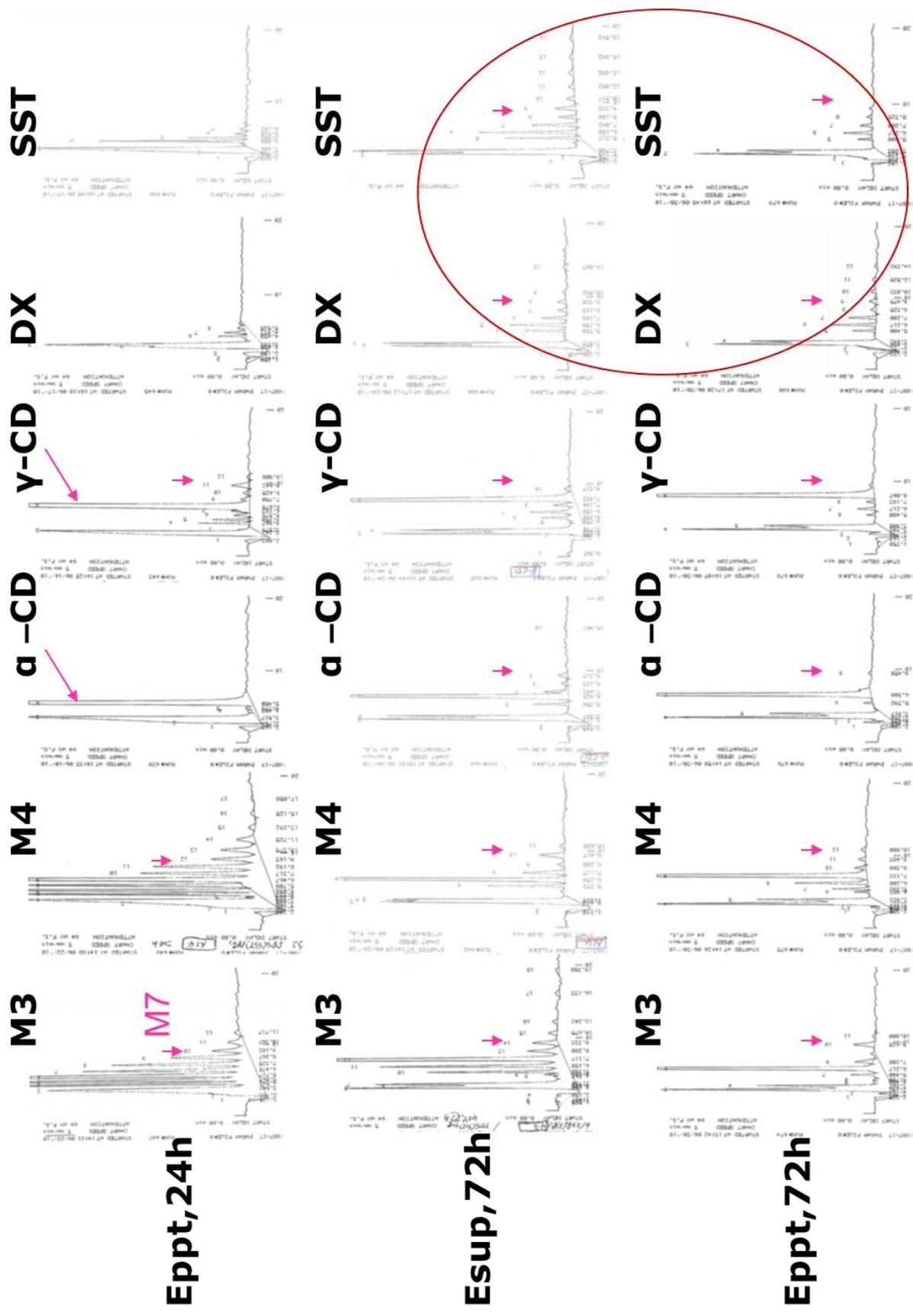


図 6. 各種基質による長時間反応生成物の HPLC 分析

## (2) 酵素活性の分画

予備実験として初めに、Sephacryl S-200 で新たに分画して得られた4つのピーク（溶出順にP1からP4とした）を酵素液として用いて基質SST, DXへの作用を測定した(図7)。SSTと反応させたサンプルにもCIやM7に近いピークが検出されていることから、特にP3, P4にはデンプンに作用するアミラーゼ様の酵素が含まれていることが示唆された(図8)。DXと反応させたP1, P2では比較的多くのCIと思われるピークが生成されていた。量は少ないものの、P3, P4にもCIができてるように見え、CITaseの存在が推定される(図9)。

基質SST, DXともほぼすべてのパターンに、CI7~9と見られる3つのピークが検出されていた。このことから、 $\alpha$ -1,4結合型基質からも $\alpha$ -1,6結合型基質からも同じような組成の反応生成物が生じていることが推察された。

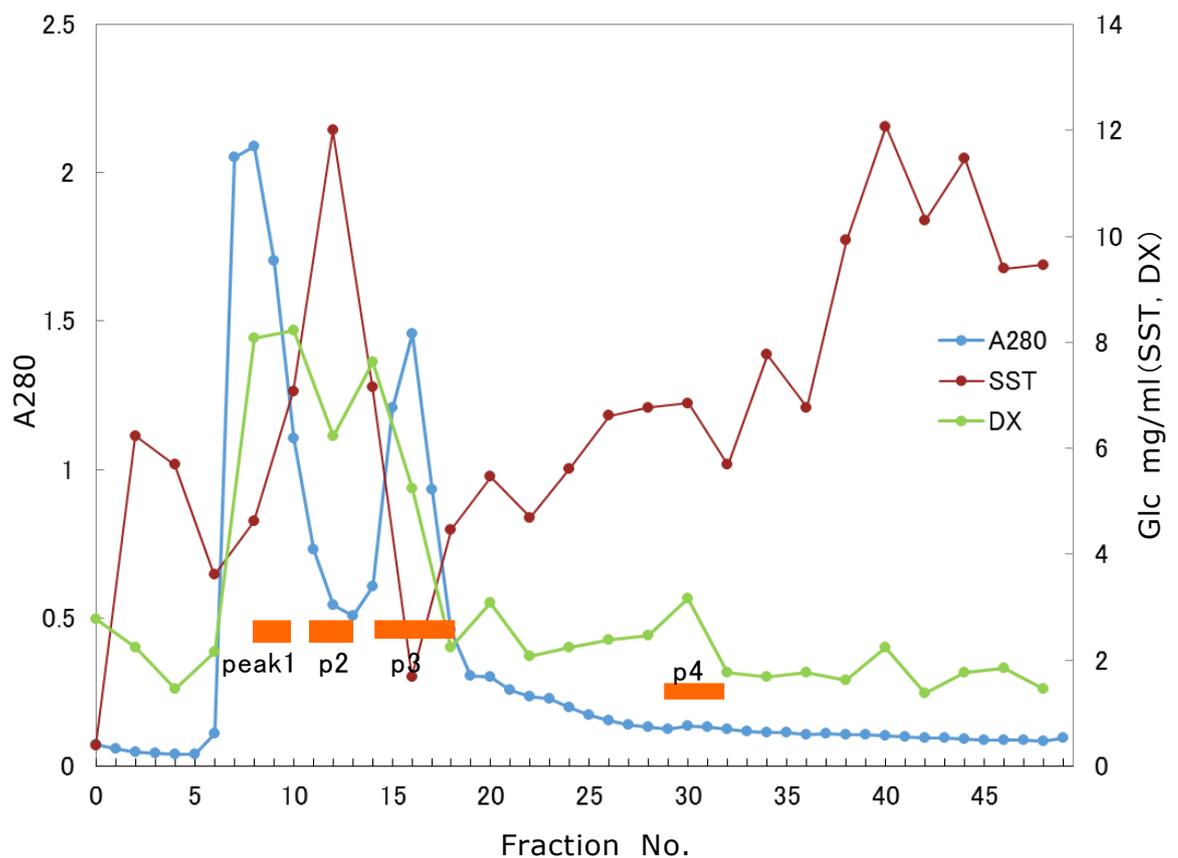


図7 Sephacryl S-200 カラムによる分画 (1)

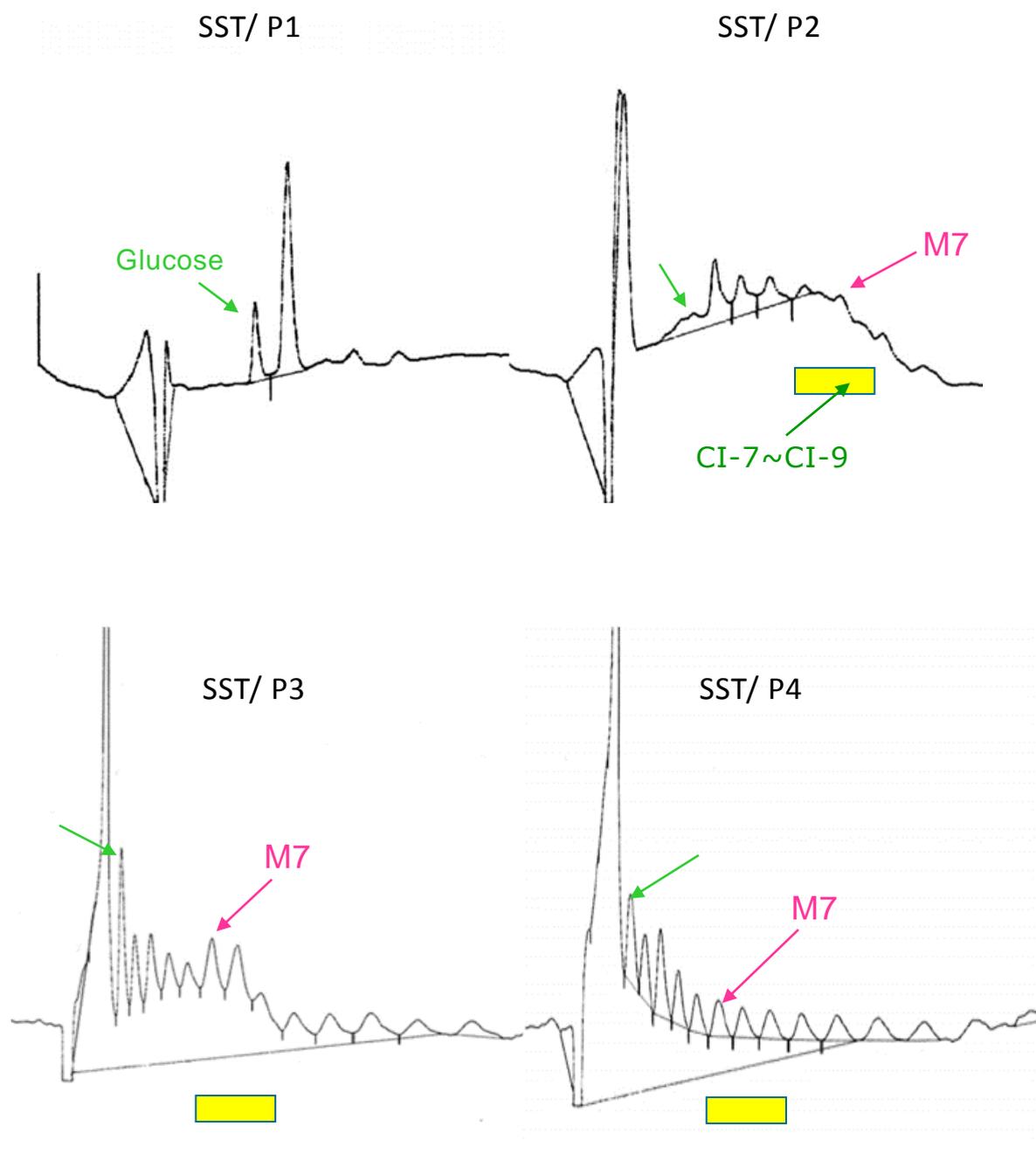


図 8. 基質 SST による反応生成物の HPLC 分析

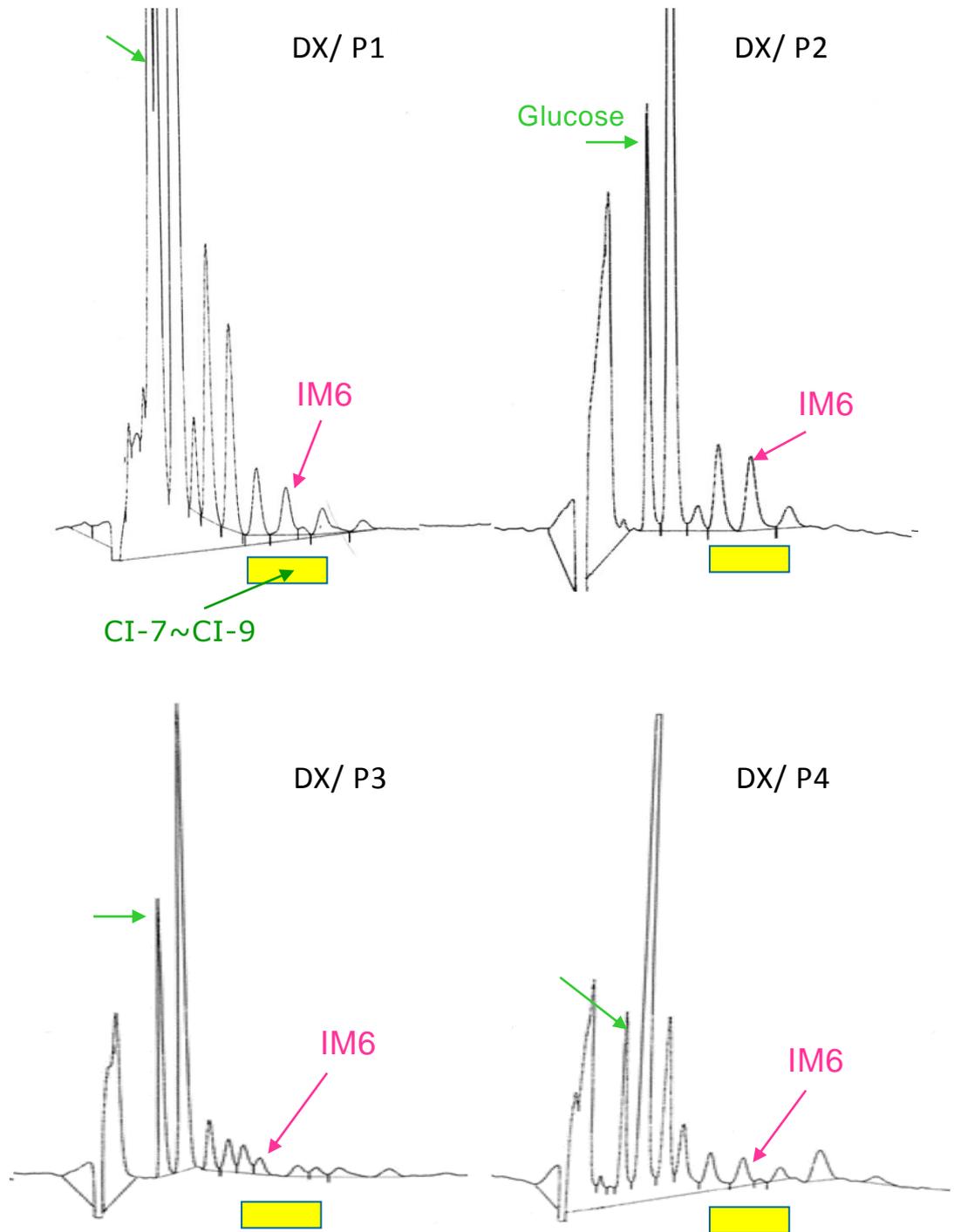


図 9. 基質 DX による反応生成物の HPLC 分析

次にゲルろ過を行い，粗酵素の分画について検討した。Sephacryl S-200 カラムで分画した結果，2種類の活性ピークが検出され，基質 SST に対する活性はピーク 1，2 共に見られたが，ピーク 2 の方が大きく，DX に対する活性はピーク 2 の方がかなり大きいことが分かった（図 10）。この活性画分をそれぞれ回収し PVP 濃縮したものを以降の実験に使用した。

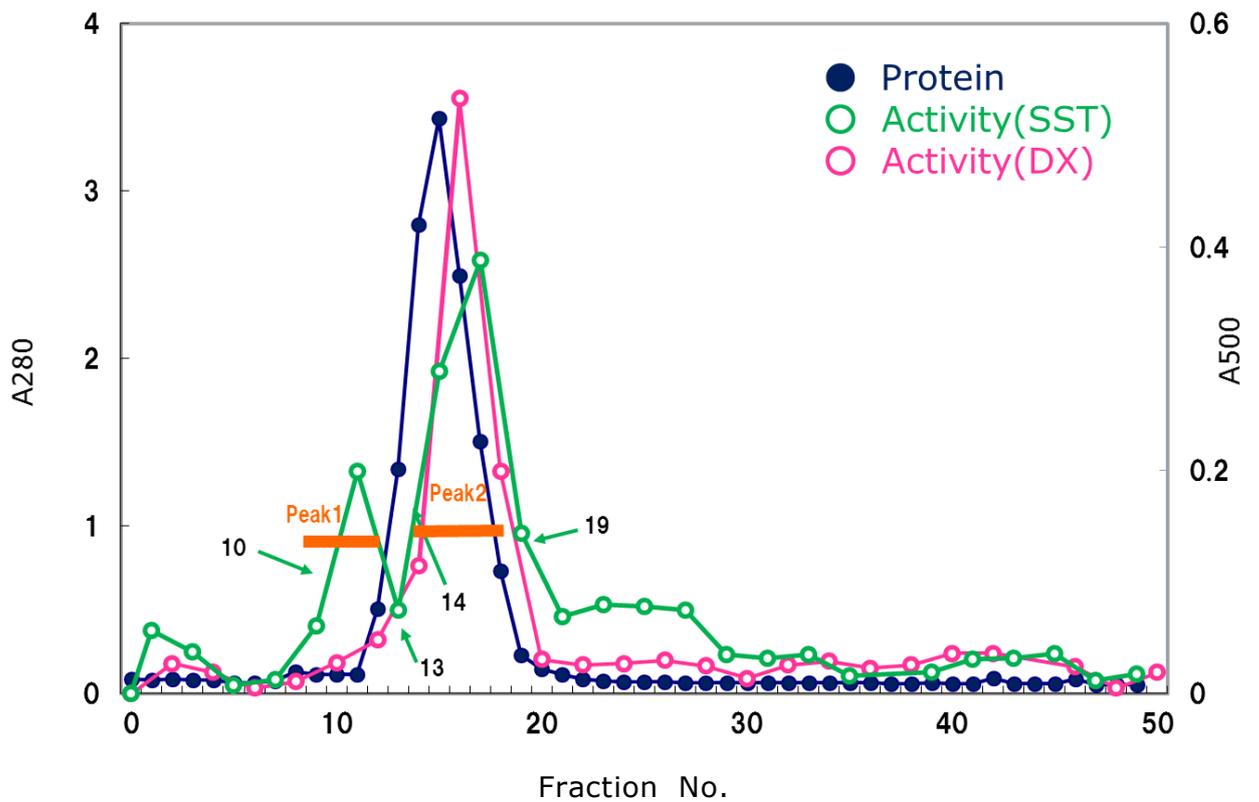


図 10. Sephacryl S-200 による分画 (2)

### (3) 酵素の作用特異性

Sepacryl S-200 カラムによって部分精製した酵素のピーク 1 (P1) と 2 (P2) を、マルトース (M2) からマルトヘプタオース (M7) までの重合度の異なるマルトオリゴ糖に作用させ、TLC, HPLC により反応生成物の分離と同定を行った。

M2 から M4 と反応した試料を TLC で分析した。検出されたスポットから、基質の分解による低重合度のオリゴ糖の生成とともに、基質よりも高重合度のマルトオリゴ糖が生成されていることが分かった。すなわち、M2 からは M4, M3 からは M4~6, M4 からは M5~7 などが検出された (図 11)。

また HPLC の結果から、P1, P2 とともに基質としたマルトオリゴ糖をその重合度に関わらず加水分解し低分子化することが示された。しかし、基質よりも高重合度のマルトオリゴ糖が多数生成されていることから分子の再配列、すなわち disproportionation (ディズプロポーションション) 反応が起こっていることも認められた (図 12)。親株である *B. circulans* T-3040 株もこの反応性を持っており、同様の disproportionation 反応を行い、基質として用いた原糖よりも高重合度のオリゴ糖を多数生成している。高重合度のマルトオリゴ糖の生成は M3, M4 で顕著であり、このサイズの基質が酵素の転移反応に適していることが推測された。

次に、P1, P2 を環状オリゴ糖の CD に作用させ、HPLC で分析した。P1, P2 は 3 種類の CD に対していずれも加水分解作用を示した。 $\alpha$ -CD からは、P1, P2 酵素の作用により Rt が CI-7, 8, 9 に近い 3 種のピークが検出された。これ以外にもグルコース、M2~M5 などの複数の反応生成物が検出された。CI7~9 に対応するピークは、G22-10 変異株の培養液および粗酵素標品による反応生成物中に CI の存在が認められなかったことから、 $\alpha$ -1,4 または  $\alpha$ -1,6 シリーズのオリゴ糖である可能性が高い。 $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD でも Rt が 10 分前後のピークが見られた (図 13)。CD へ作用したことにより、本酵素はエンド型の働きを持っていることが示唆された。

反応に用いた基質 SST および DX の酸加水分解物のオリゴ糖に酵素 P1, P2 を反応させた結果、ブランクに比べ、低重合度のオリゴ糖のピークが減少し、高重合度のオリゴ糖の増加が認められた (図 14)。このことから、本酵素がオリゴ糖に作用して分子の再配列を行っていることが示唆される。

以上の結果から、本酵素は  $\alpha$ -1,4 結合型、 $\alpha$ -1,6 結合型の基質に作用し加水分解する活性を持ち、また分子の再配列を行うことが示唆された。その際に  $\alpha$ -1,4 結合型基質から  $\alpha$ -1,6 結合型の生成物を生産し、またその逆の反応

も起こっていることから本酵素はこれまでにない、新規の性質を持っている酵素である可能性が示唆された。

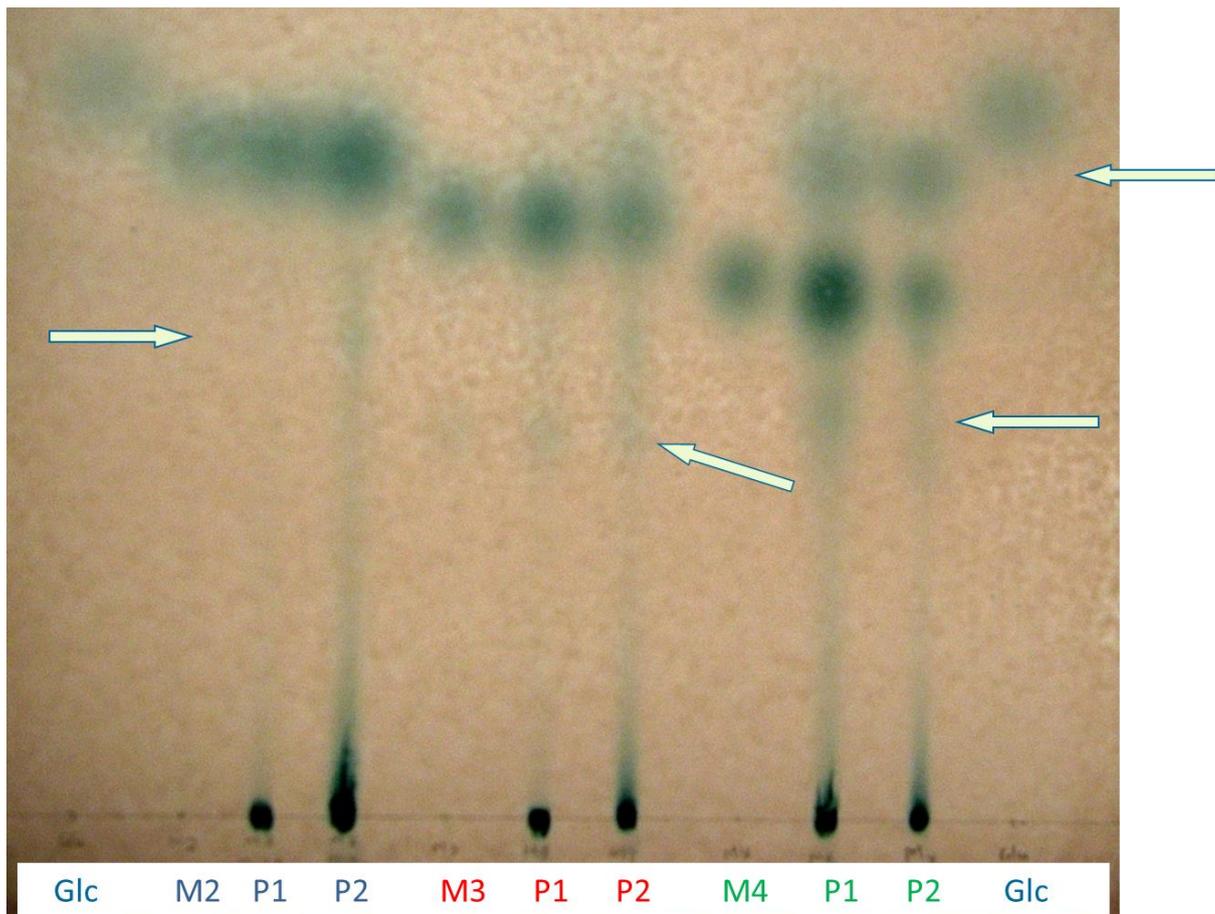


図 11. 部分精製酵素による M2~M4 の加水分解反応生成物の TLC 分析



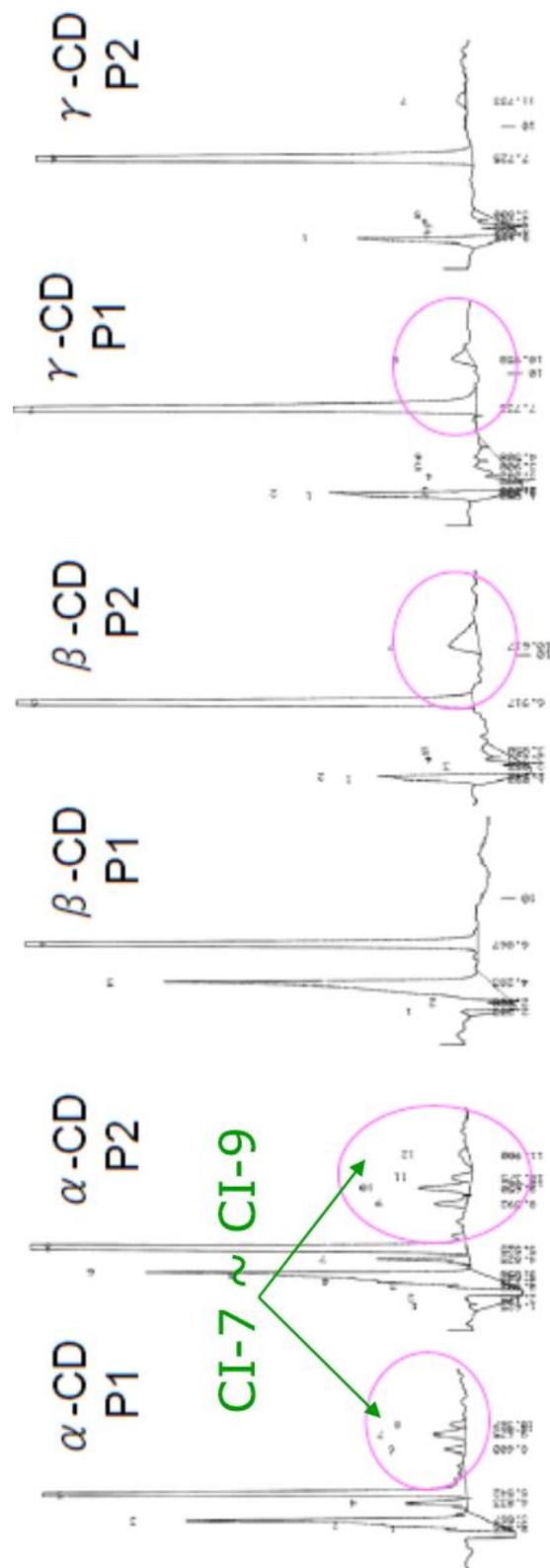


図 13. 部分精製酵素による  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD の加水分解反応生成物の分析

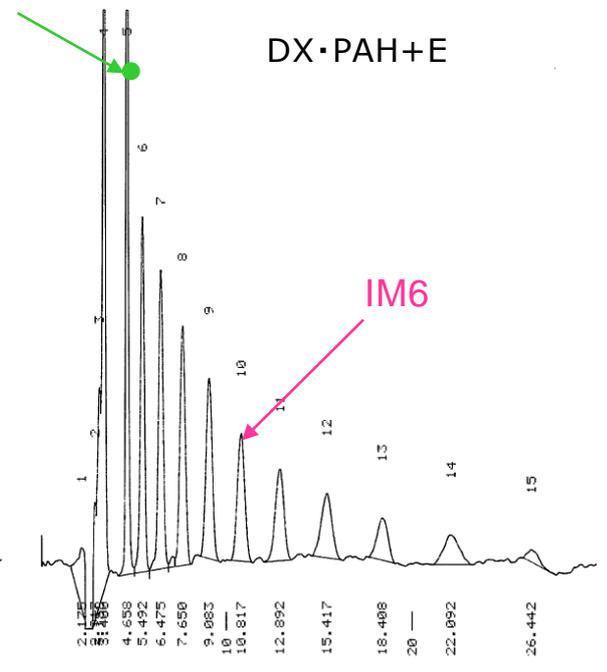
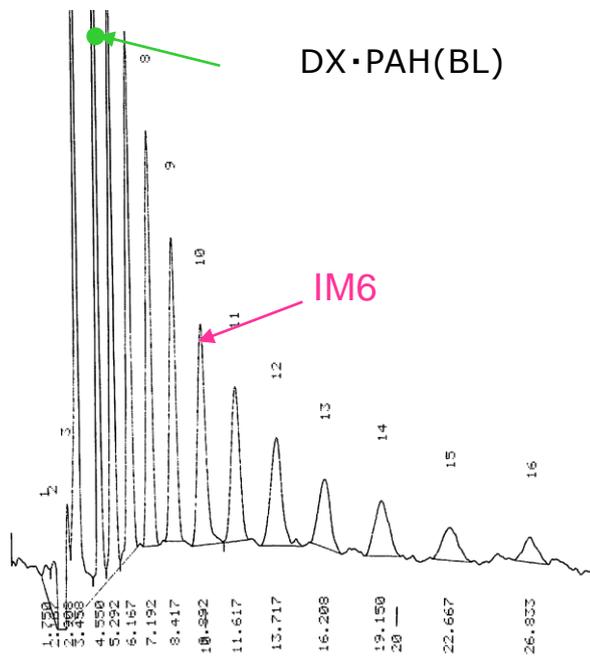
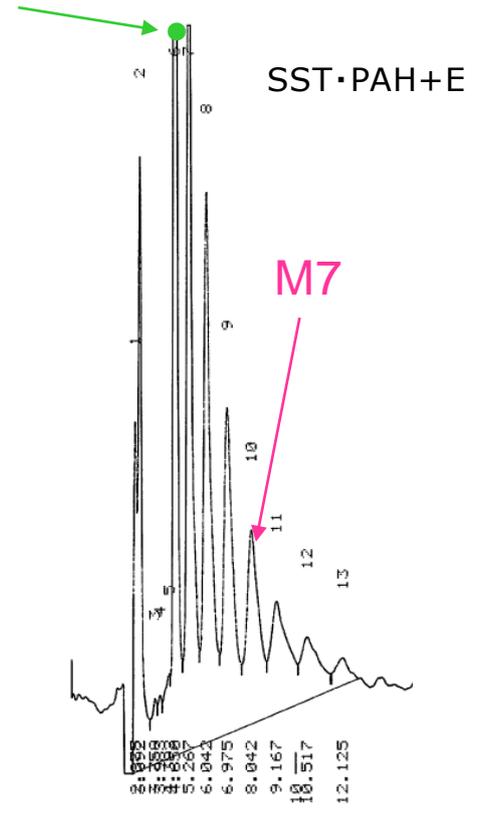
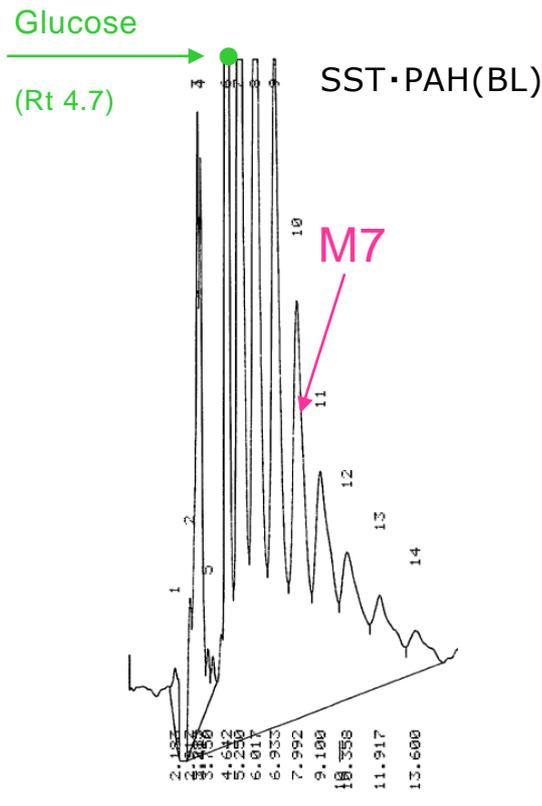


図 14. 部分精製酵素によるマルトオリゴ糖および  
イソマルトオリゴ糖基質への作用

マルトオリゴ糖と各種 CD の重合度によって本酵素の作用性の違いの関係を調べた。各酵素を基質に作用させて加水分解の強さをネルソン-ソモギー法により測定した。グラフが右肩上がりになっていることから、重合度が高くなると酵素作用も高くなることが分かった。また環状オリゴ糖の CD についても同様の結果となったが、対応するグルコースの重合度で比較すると M6 より  $\alpha$ -CD, M7 より  $\beta$ -CD のほうがやや高い値が得られており、環状オリゴ糖に対する加水分解活性の方が高いと推定された (図 15)。

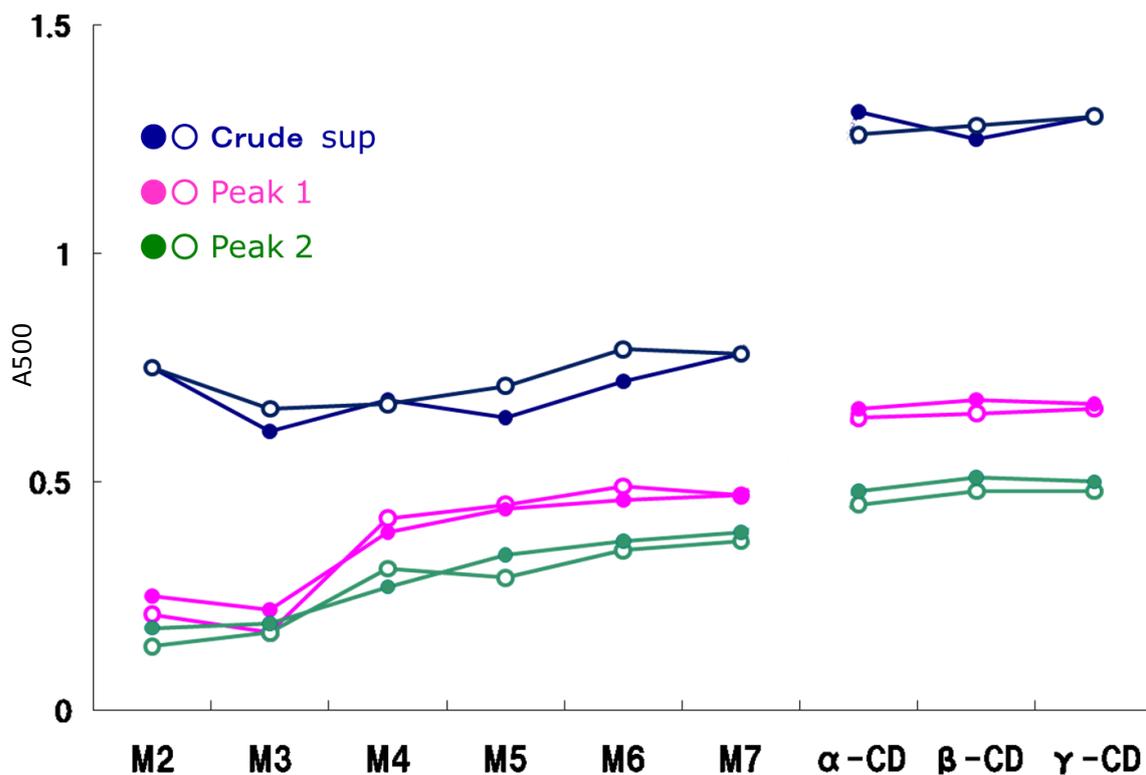


図 15. 基質の重合度と部分精製酵素の作用性の関係

これまで示した HPLC の結果に見られるように  $\alpha$ -1,4 シリーズ,  $\alpha$ -1,6 シリーズ, CD および CI の溶出は極めて近似しているため, オリゴ糖相互の分離の可否について検討した。HPLC での反応生成物の溶出パターンを, SST, DX の酸加水分解物の HPLC 結果をもとに横軸に重合度, 縦軸に溶出時間 (Rt) をとり, 対数グラフにした (図 16)。同じ重合度で比較すると, マルトオリゴ糖の方がイソマルトオリゴ糖よりも早く溶出されていた。マルトオリゴ糖と比較して, CI の Rt はやや早い程度であるのに対して, CD は極めて早く溶出されている。これは, CD の高い疎水性の性質および環状と直鎖状での挙動の違いによると考えられる。また, IM6 と M7, CI-8 は Rt が極めて接近しており, HPLC で生成物を見分けるには注意を要することが分かった。

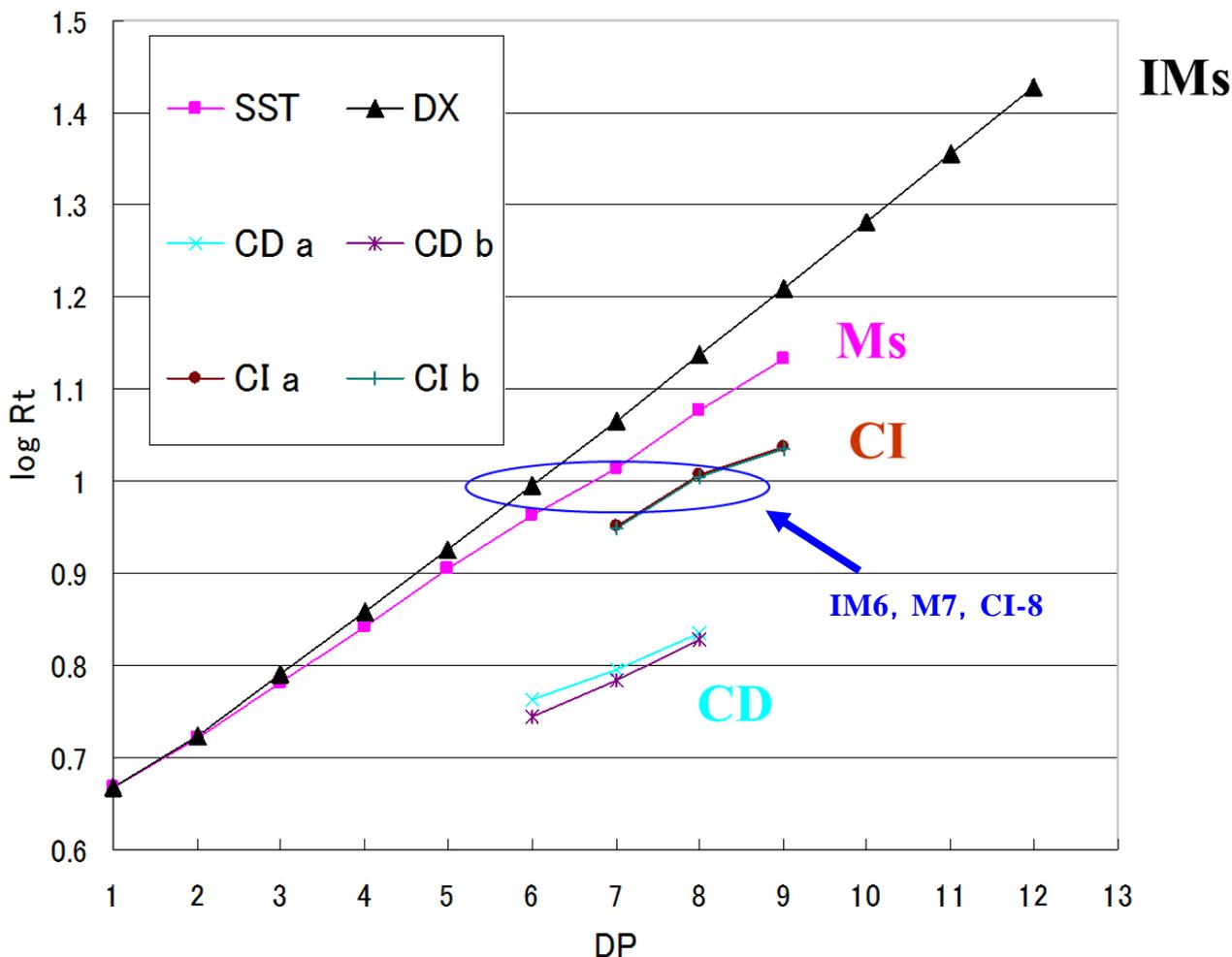


図 16. 各種基質の重合度と HPLC の溶出時間との関係性

### 3. 酵素の多型と夾雑多糖の存在

後述のように G22-10 変異株の酵素は各種カラムによる精製の過程で複数の活性ピークに分離したり、著量の糖質を伴って溶出されることが明らかになった。このことは本酵素の精製において大きな障害となっていたことから、本酵素の存在形態に関する知見を得るために電気泳動による分析を行った。ホウ酸緩衝液が糖質と複合体を形成すること<sup>45)</sup>を利用して本酵素と挙動を同じくする糖質（夾雑多糖）との分離を試み、0.2 M ホウ酸緩衝液に溶解した粗酵素を Native-PAGE に供した結果、複数のタンパク質バンドが得られた（図 17）。

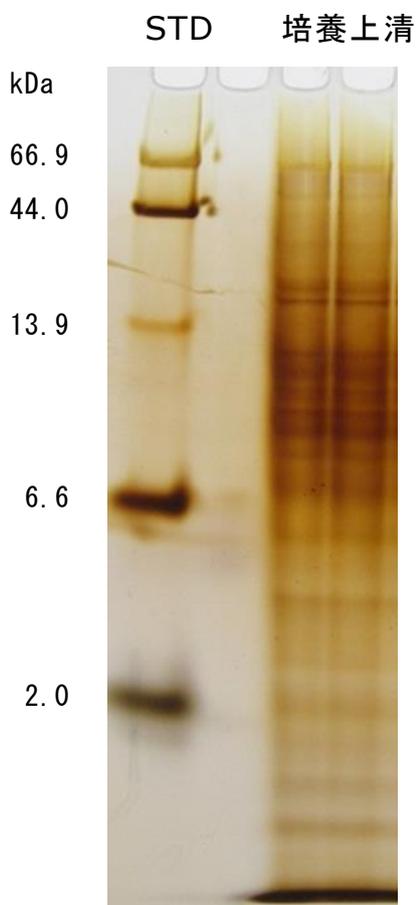


図 17. 粗酵素の Native-PAGE 分析

泳動したゲルを巾 5 mm の切片に切り出して酵素活性を測定したところ、SST, DX いずれにおいても切片#1 と#2 に強い分解活性がみられ、ついで SST に対しては#3 から#11 まで、DX に対しては#3 および#4, #7 から#9 までにやや強い分解活性が広い範囲で検出された(図 18)。すなわち、基質 SST, DX に作用する活性ピークが複数成分検出され、基質の種類に関わらずほぼ同位置に同程度の活性を示すことが分かった。このように、同一の作用を示す酵素が複数成分存在し、分子量が異なることから、酵素タンパク質に上述の夾雑多糖が結合して複合体を形成し、見かけの分子量を大きくしている可能性が示唆された。

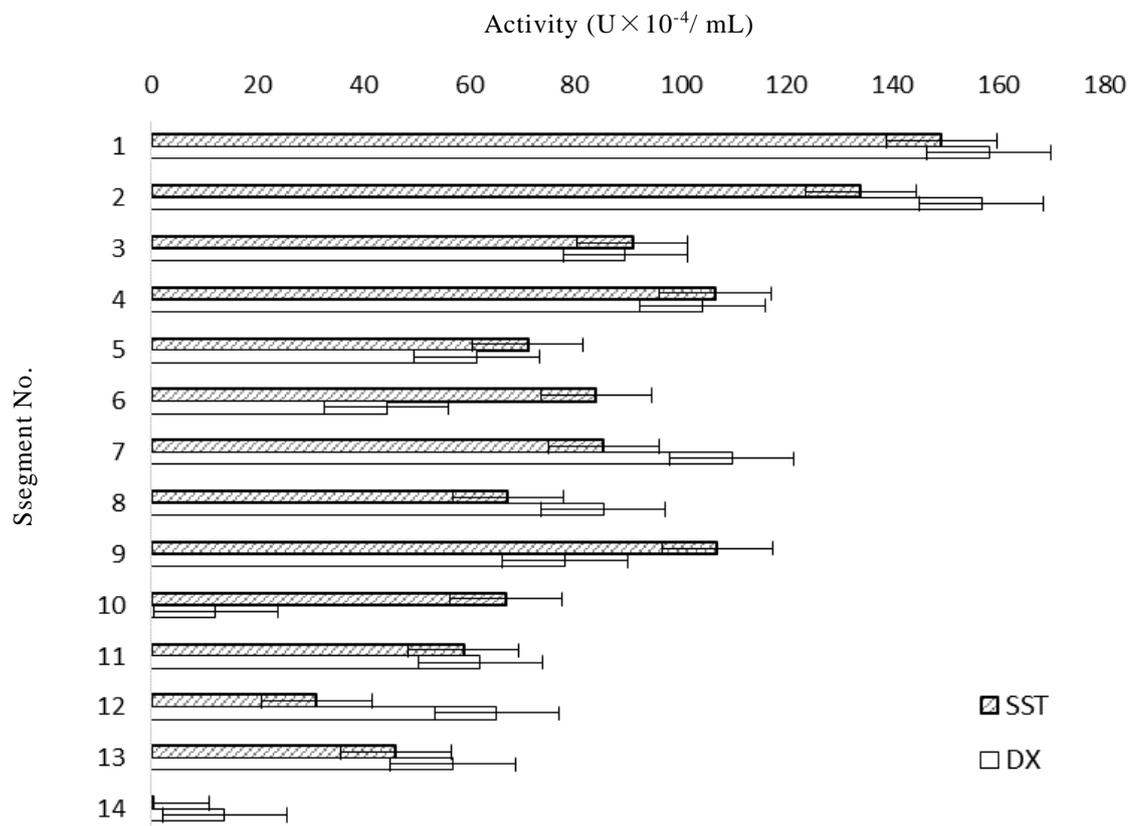


図 18. Native-PAGE のゲル切り出しによる酵素活性測定

そこで本酵素を唾液 $\alpha$ -アミラーゼで経時的に処理したものを SDS-PAGE に供した (図 19)。その結果, 高分子画分のタンパク質バンドは $\alpha$ -アミラーゼ処理の反応時間に応じて徐々に減少し, 低分子画分のバンドが増加して行くことが認められた。これは,  $\alpha$ -アミラーゼによって酵素タンパク質に結合していた夾雑多糖が分解され, 徐々に低分子化してくるためと判断された。

以上のことから, 本酵素は培養時の基質として用いた SST, あるいは DX から酵素作用により生成した SST 様の多糖に高い親和性を示し, 複合体を形成して存在するために多形を呈するものと推測された。酵素の多形には自身のオリゴマー型の存在も考えられる。

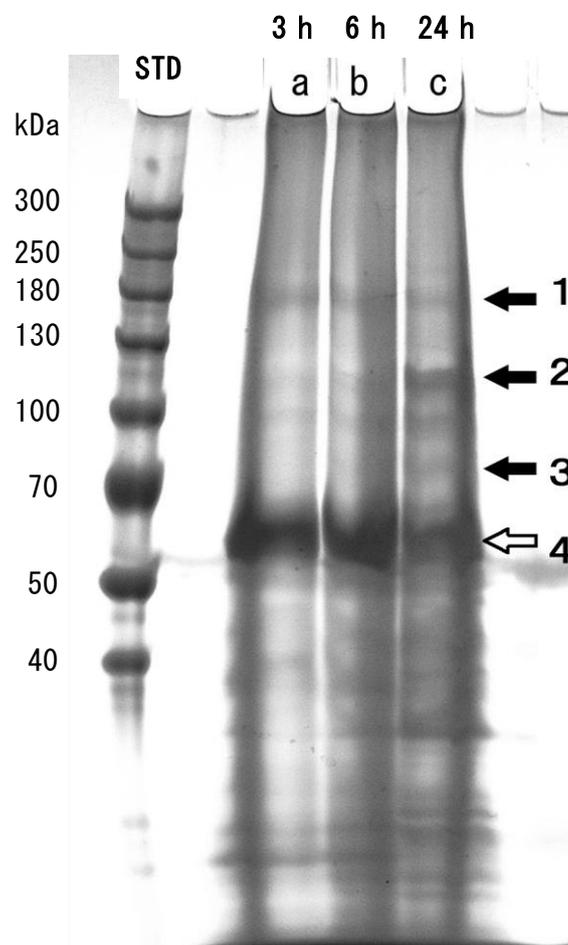


図 19. 粗酵素の $\alpha$ -アミラーゼ分解の経時変化 SDS-PAGE

#### 4. カラムクロマトグラフィーによる酵素の精製法の検討

酵素の精製法を確立するために、各種のカラムクロマトグラフィーを用いて精製条件等の検討を行った。

##### (1) イオン交換クロマトグラフィー

###### 1) DEAE-Toyopearl による分画

DEAE-Toyopearl ゲルでは、活性ピークは素通り部分に溶出され、夾雑タンパク質との分離もできたが、メインの活性画分に見られる大量の夾雑多糖との分離はできなかった(図 20)。

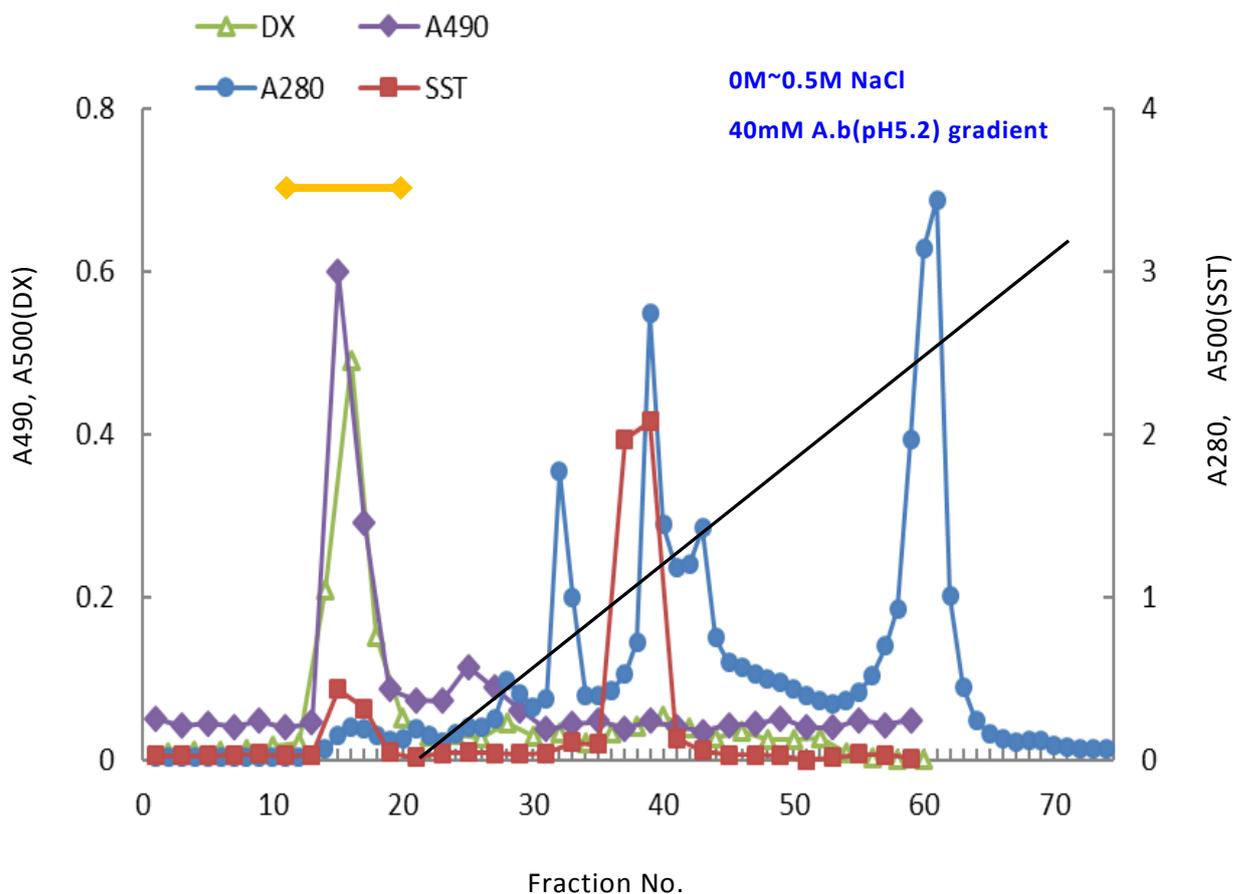


図 20. DEAE-Toyopearl による分画

## 2) CM-Toyopearl による分画

CM-Toyopearl ゲルでは、活性は大きく見えたものの、活性画分と夾雑タンパク質との分離はできなかった(図 21)。

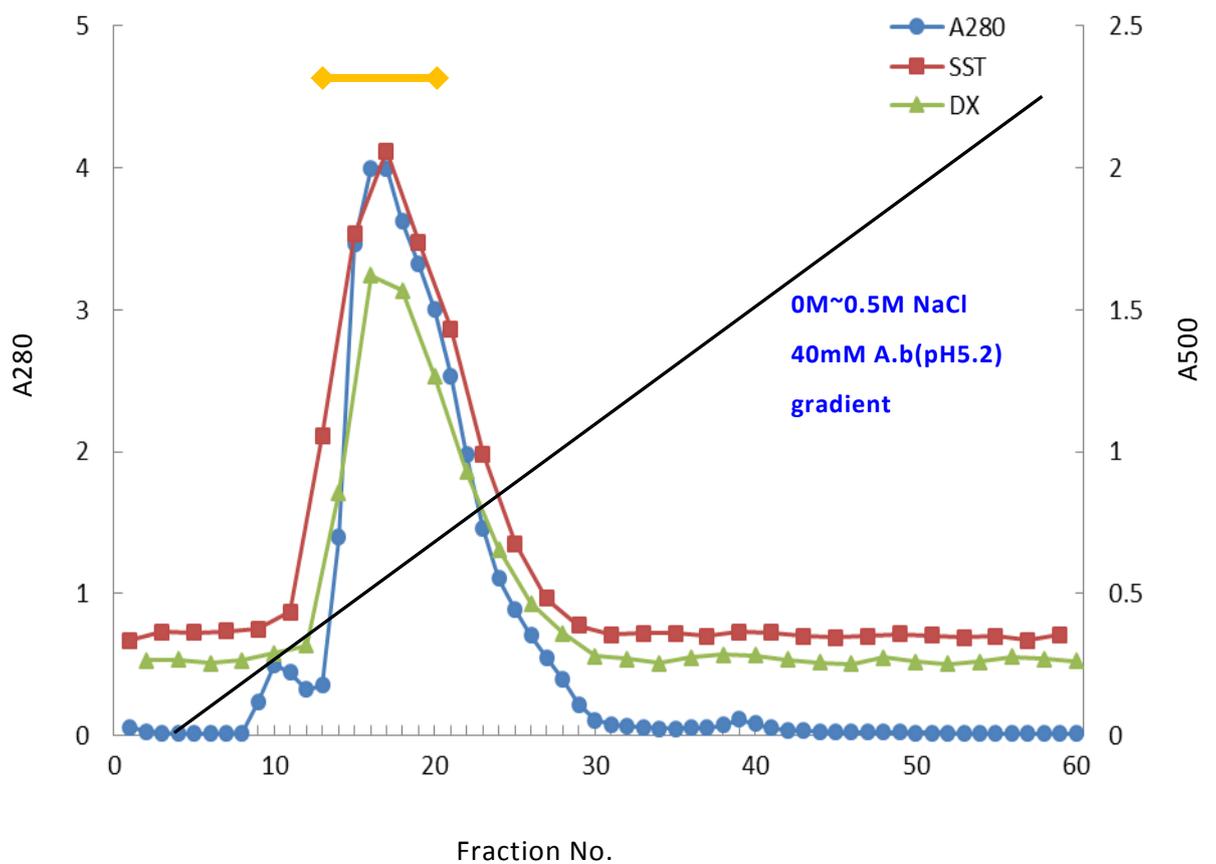


図 21. CM-Toyopearl による分画

### 3) DEAE-Sephadex による分画

DEAE-Toyoparl ゲルでは活性は素通り画分に溶出され、夾雑タンパク質との分離もできたが、活性画分がグラジエント画分にも分散して溶出されており、活性の回収率はあまりよくなかった(図 22)。

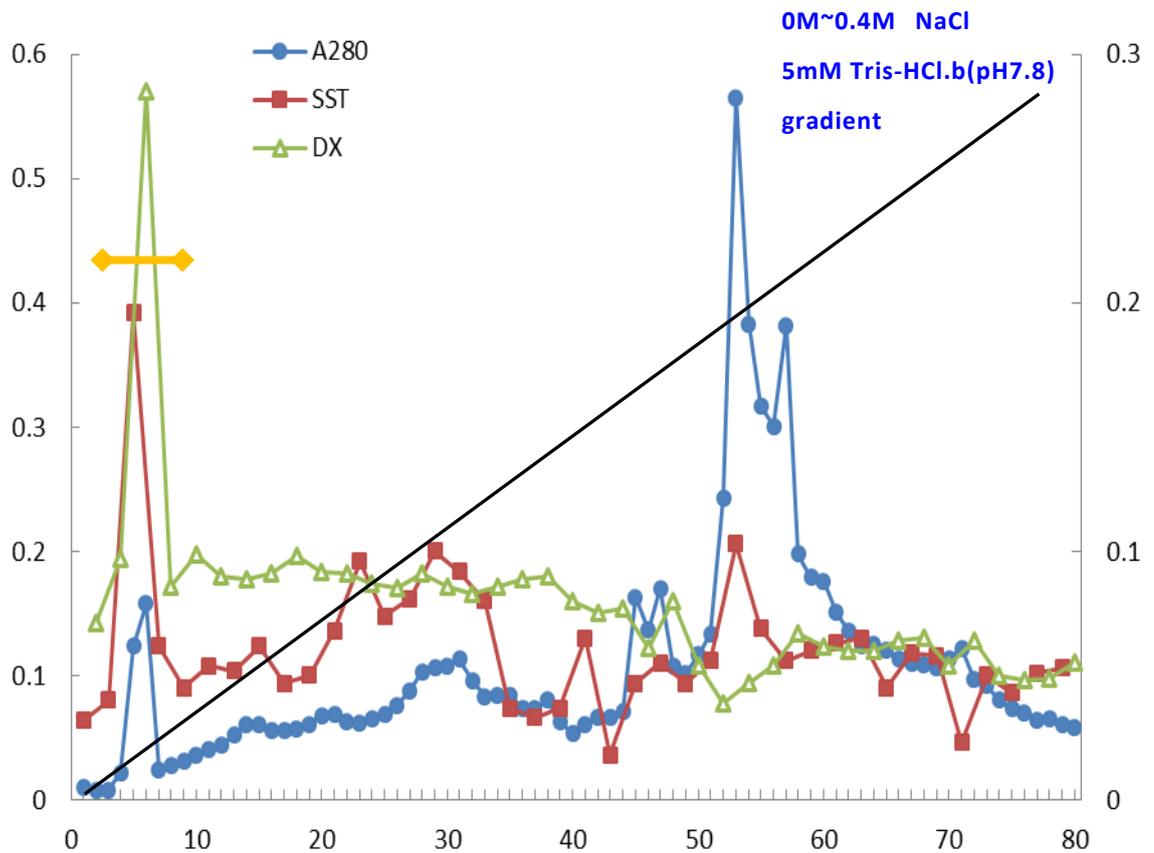


図 22. DEAE-Sephadex による分画

#### 4) MCI-gel による分画

MCI-gel では、活性、タンパク質ともに素通り画分に多量に溶出され、夾雑タンパク質との分離はできなかった(図 23)。

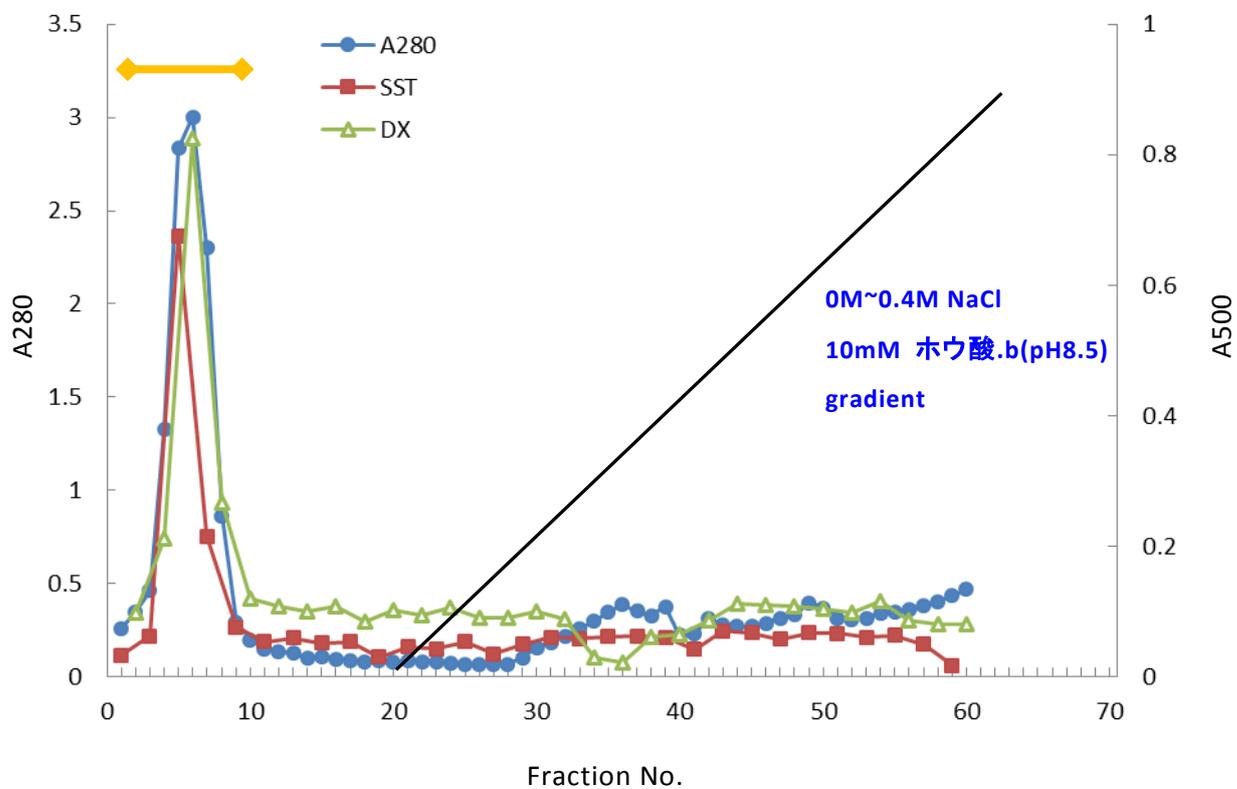


図 23. MCI-gel による分画

### 5) QAE-Toyopearl による分画

QAE-Toyopearl カラムでは、メインの活性ピークは SST, DX とともにフラクションナンバー #8 前後に溶出され、その他の夾雑タンパク質の多くは食塩濃度が上がるにつれて後半部分に溶出されていることから、このカラムは精製に適していると考えられる (図 24)。しかし、別の実験から素通り画分には糖質が多量に溶出され活性ピークと重なっていることが分かった。

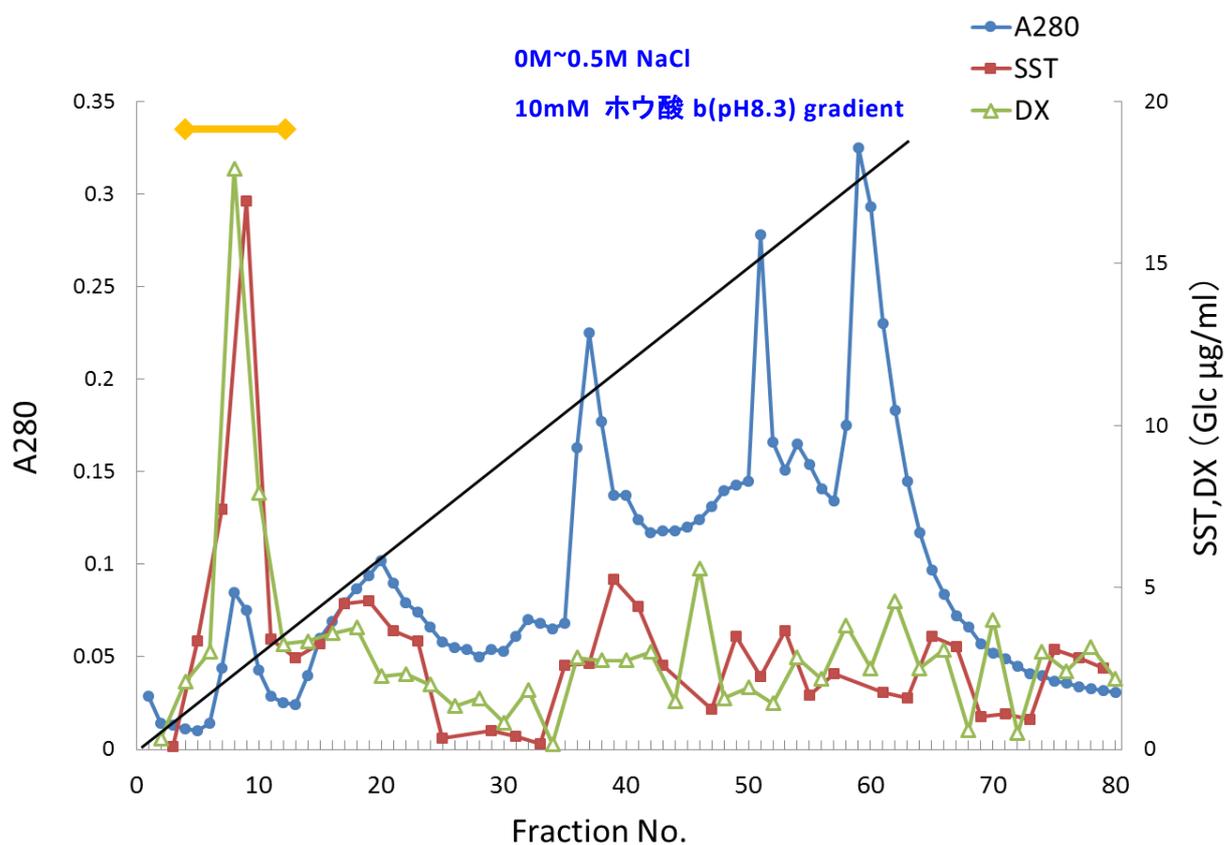


図 24. QAE-Toyopearl による分画(1)

(2) アフィニティーカラムクロマトグラフィー

1) Sephadex G-25 カラムによる分画

Sephadex G-25 ゲルおよびエピクロルヒドリンで架橋したコーンデンパンゲルを用いたアフィニティーカラムによる酵素の精製の検討を行った。Sephadex G-25 ゲルでは、硫酸を含まない後半部分に活性が現れたが、前半の素通り部分に最も大きく活性が現れており活性画分の回収効率が良くないため、このカラムでの精製は断念した (図 25)。

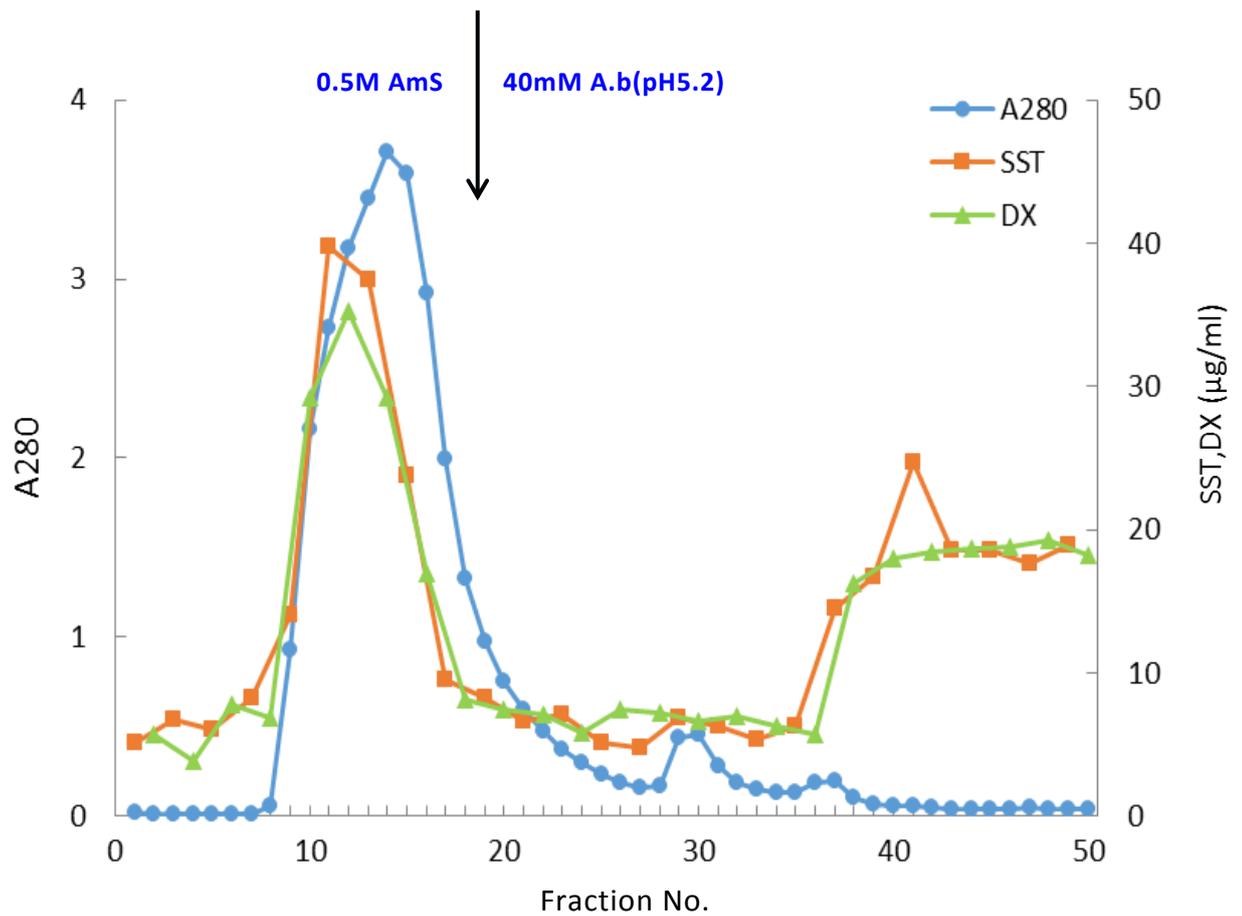


図 25. Sephadex G-25 カラムによる分画

## 2) SST-EP ゲルカラムによる分画

SST-EP ゲルも先の Sephadex G-25 カラムと同様に硫酸を含まない後半部分に活性が現れたが、どちらのカラムでも前半の素通り部分に最も大きく活性が現れており活性画分の回収効率が良くなかった(図 26)。

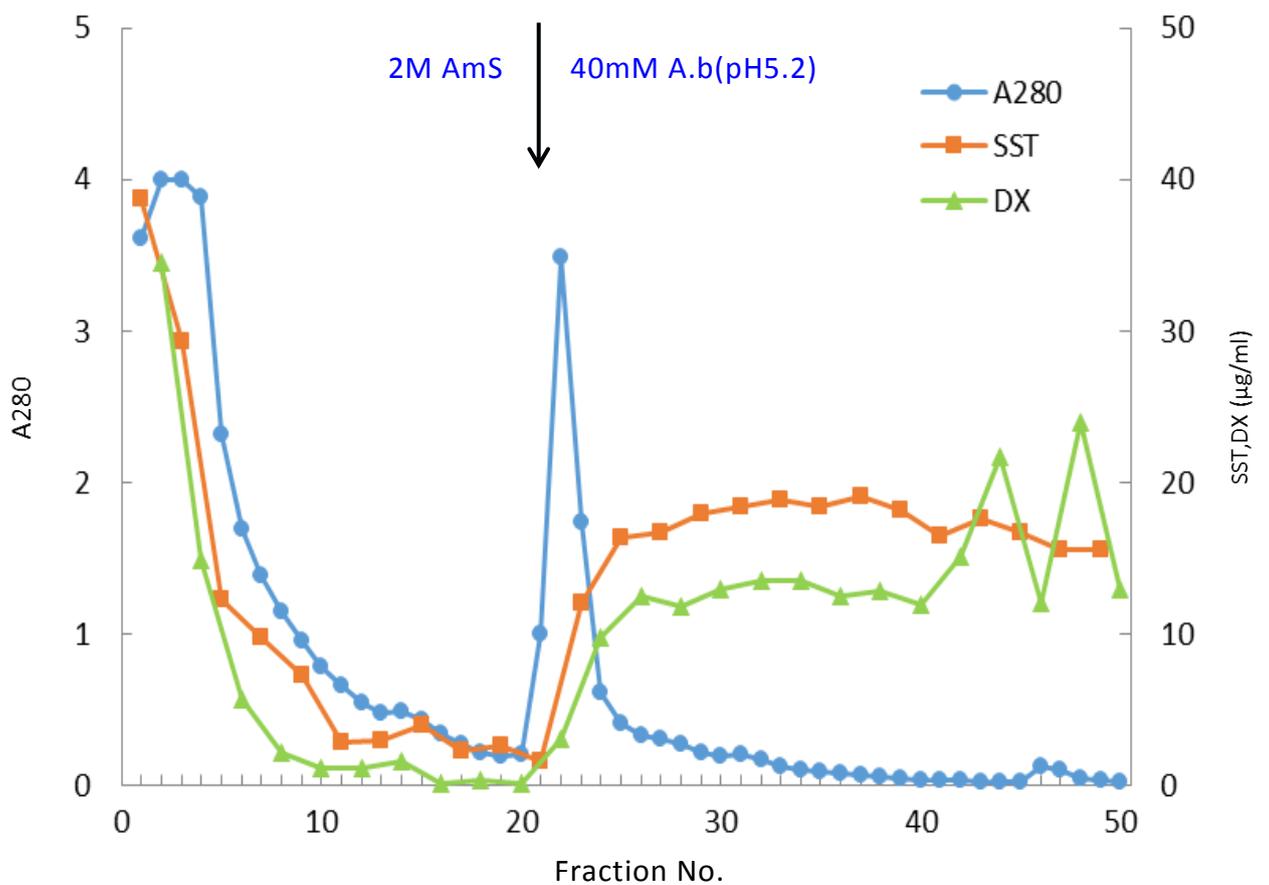


図 26. SST-EP ゲルによる分画

(3) 疎水性カラムクロマトグラフィー

Hexyl-Toyopearl ゲルで分画した結果、先のアフィニティーカラムと同様に後半に活性が検出されたが、前半の素通り画分にも高い活性が含まれていたため、活性の回収率に問題があった(図 27)。

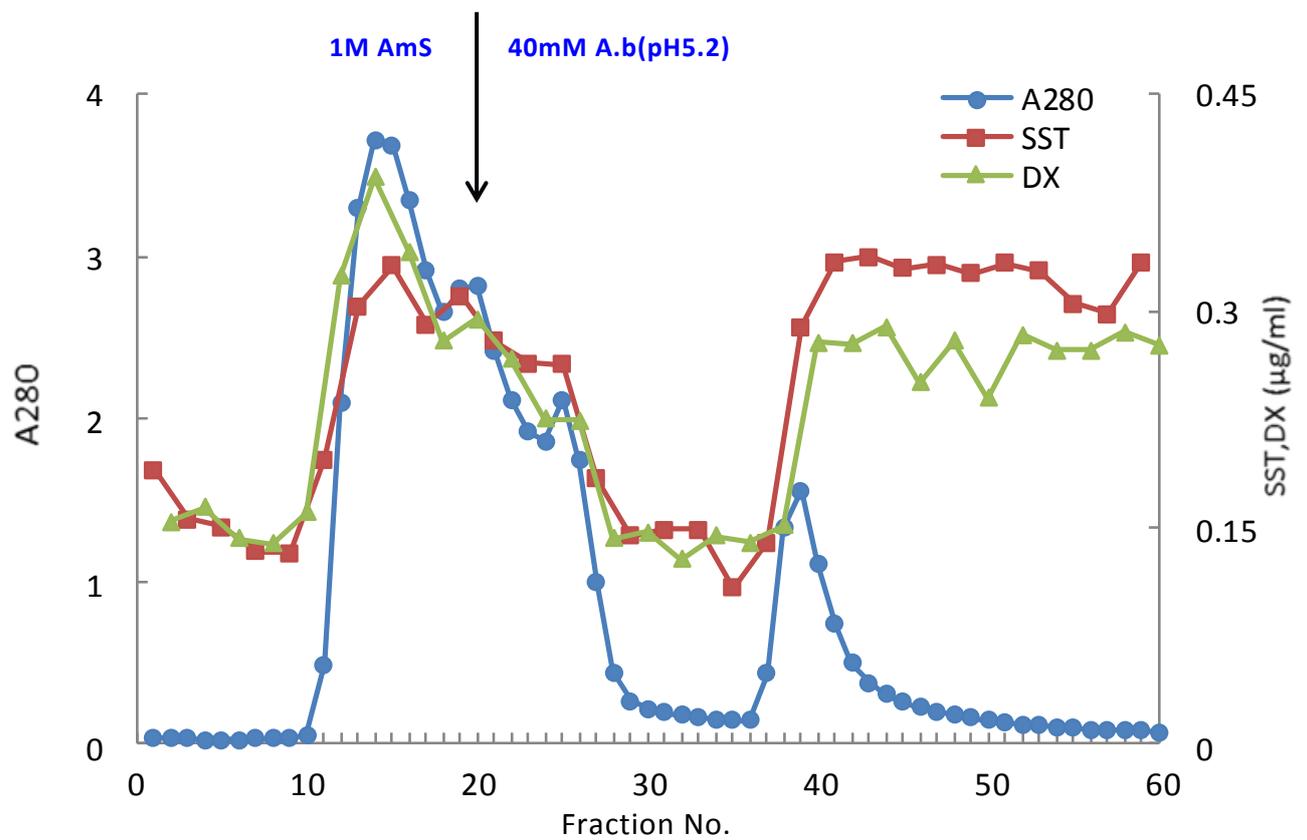


図 27. Hexyl-Toyopearl カラムによる分画

#### (4) Hydroxy-apatite カラムクロマトグラフィー

Hydroxy-apatite カラムで分画した結果, SST, DX ともに同等の強さの活性ピークが得られた。これまでのカラムと比較して活性画分の分散やロスが少なく吸着が良いといえるが, 夾雑タンパク質と活性画分が分離できないため, 精製法としては今後も検討が必要であると考えられる(図 28)。

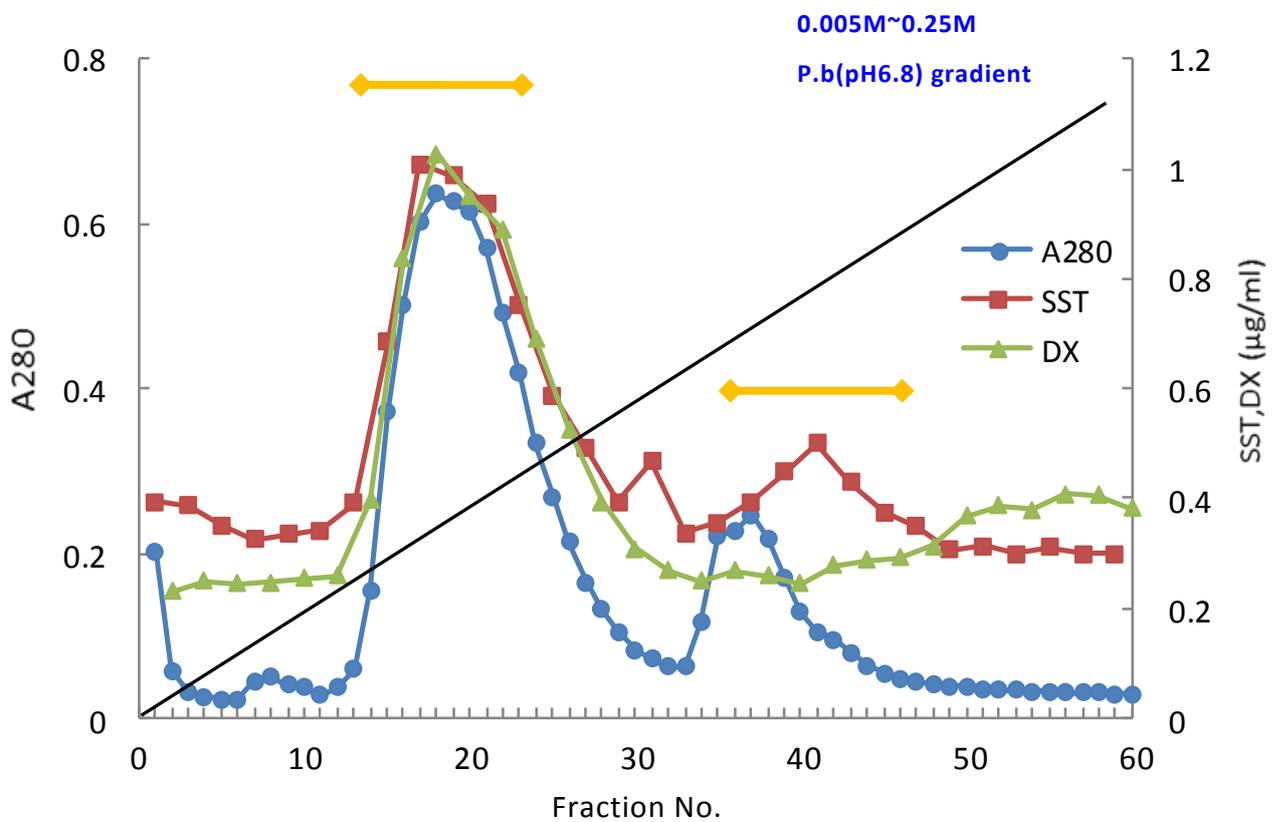


図 28. Hydroxy-Apatite カラムによる分画

(5) ゲルろ過カラムクロマトグラフィー

1) Toyopearl HW-55 カラム

酵素の精製ではなく反応生成物の分子量測定に使用した(P99, 図 52)ため結果は後述する。

2) Sephacryl S-200 カラム

QAE-Toyopearl で回収した活性画分を Sephacryl S-200 カラムで分画した結果, SST, DX とともに活性画分はほぼ同位置に溶出されたが, peak が大きく幅広いため複数の活性画分が混合しているようにも見え, 精製が不十分の可能性もあった。

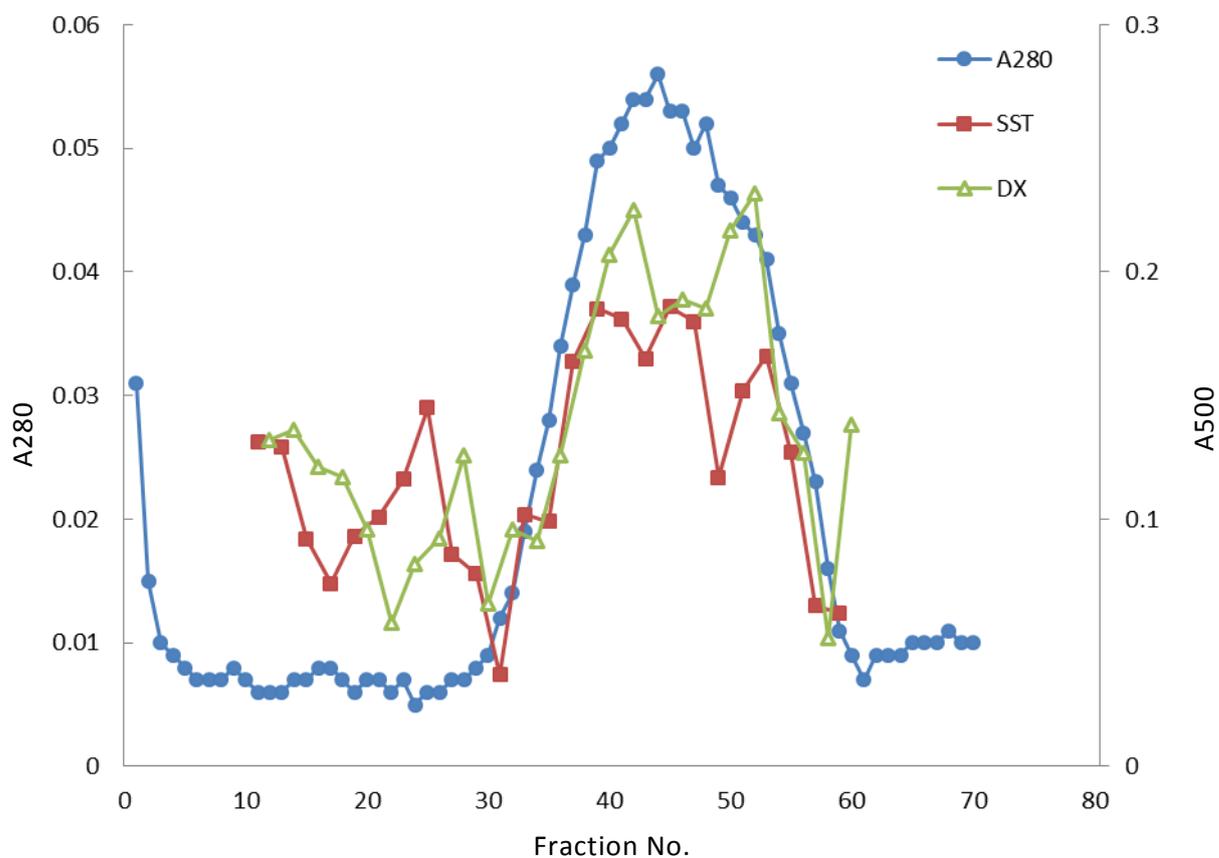


図 29. Sephacryl S-200 による分画(3)

### 3) Sephacryl S-500 カラム

先の Sephacryl S-200 カラムと同様に，QAE-Toyopearl で回収した活性画分を Sephacryl S-500 カラムで分画した結果でも SST，DX ともに活性画分はほぼ同位置に溶出され，溶出パターンもよく似ていた。

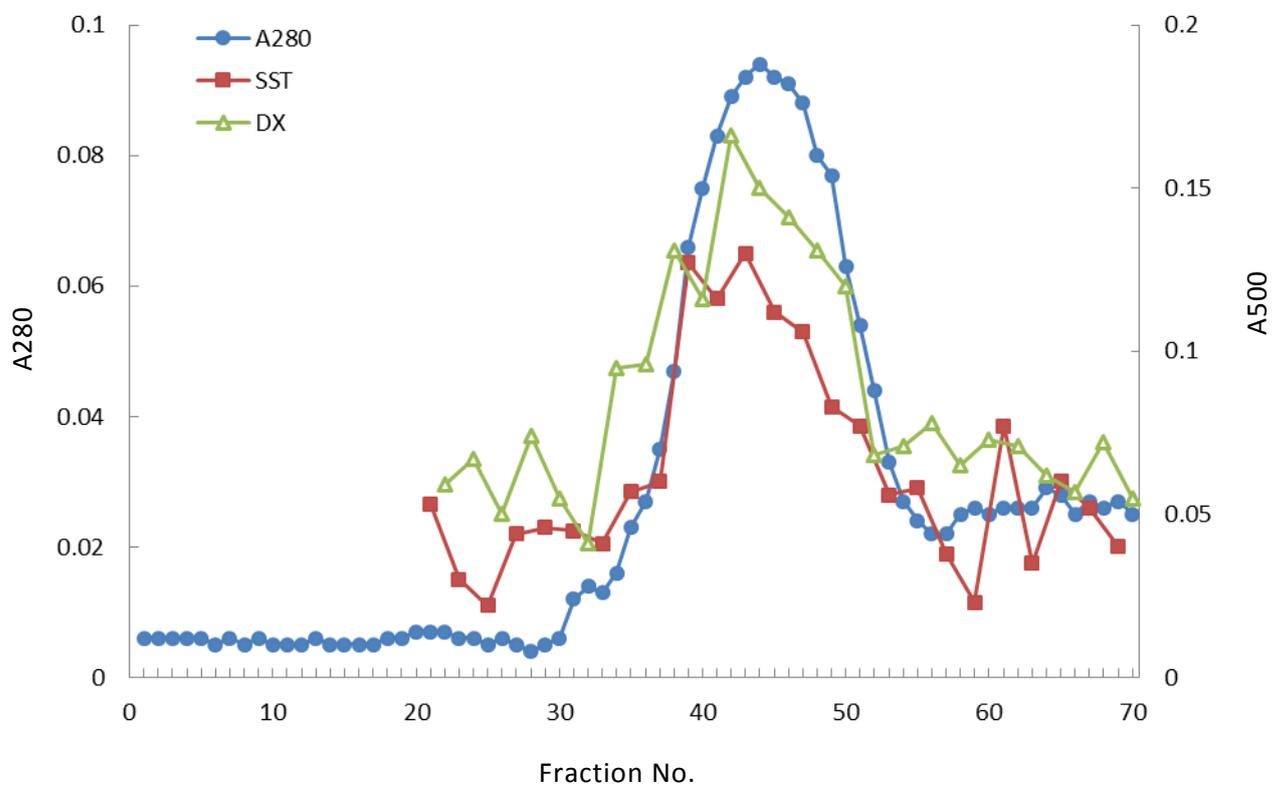


図 30. Sephacryl S-500 による分画

#### 4) Sepharose CL-2B カラム

CM-Toyopearl カラムで分画し回収した活性画分を Sepharose CL-2B カラムで分画した。SST, DX とともに活性画分はほぼ同位置に溶出されたが, CM-Toyopearl では精製が不十分のためか SST の活性 peak が複数出ていた(図 31)。

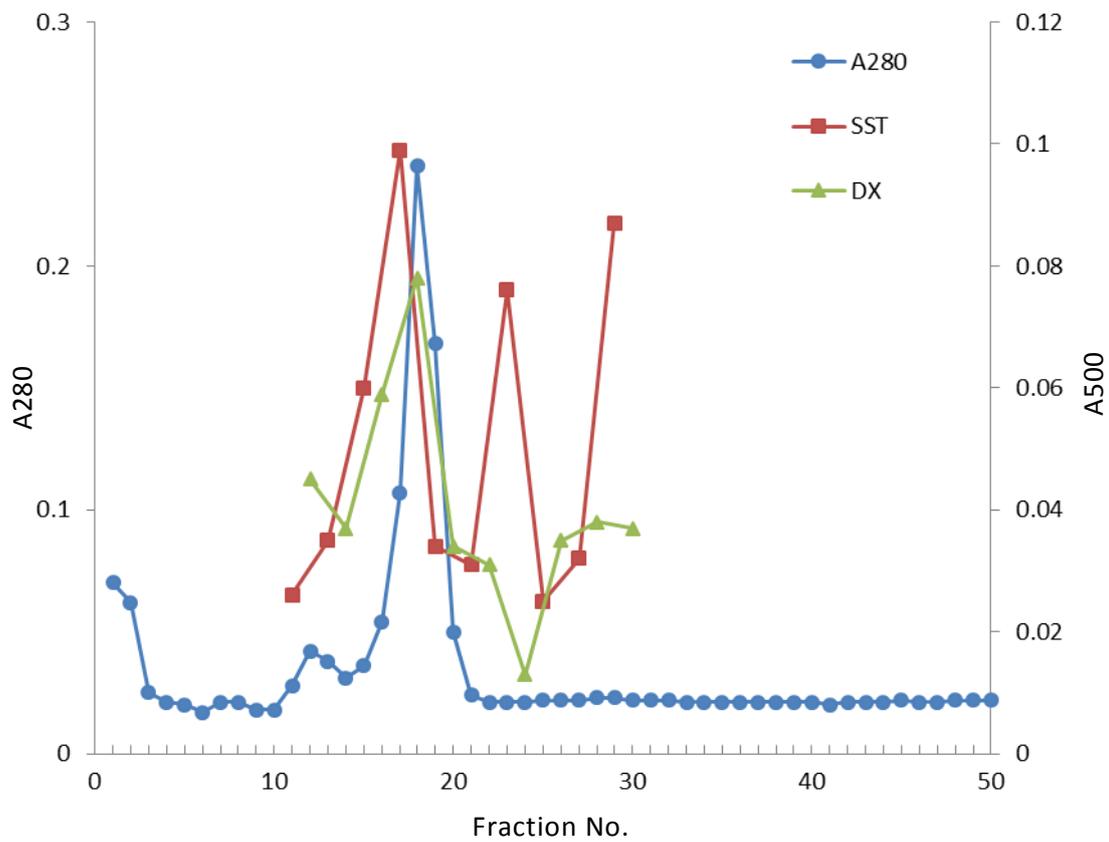


図 31. Sepharose CL-2B による分画

## 5. 酵素の精製と純度検定

### (1) G-22 変異株の酵素の精製

本酵素の精製法を確立するために行ったカラムクロマトグラフィーの予備実験の結果を踏まえて、酵素の精製を試みた。酵素の精製には QAE-Toyopearl カラムおよび Sephacryl S-200 カラムが適していることが分かったため、まず粗酵素を QAE-Toyopearl カラムに供試した。分画の結果、メインの活性ピークは基質 SST, DX による測定でともにフラクションナンバー #15 前後に溶出された。そのほかの夾雑タンパク質の多くは食塩濃度が上がるにつれて後半部分に溶出された。得られたフラクションについて A490 測定した結果、活性画分に大量の糖が含まれていることが分かった。この活性画分をそれぞれ peak1-a,b, Peak2 として回収した(図 32)。

この QAE-Toyopearl カラムで得られた活性画分を、それぞれ Sephacryl S-200 で分画した。そのグラフを比較してみると、どのパターンにも SST, DX に対する活性が見えた。しかし、すべてのグラフでタンパク質のピークと同じ溶出位置に糖が大量に溶出されており、この糖が精製を阻害して、活性画分の溶出パターンに影響している可能性が考えられた(図 33, 図 34, 図 35)。

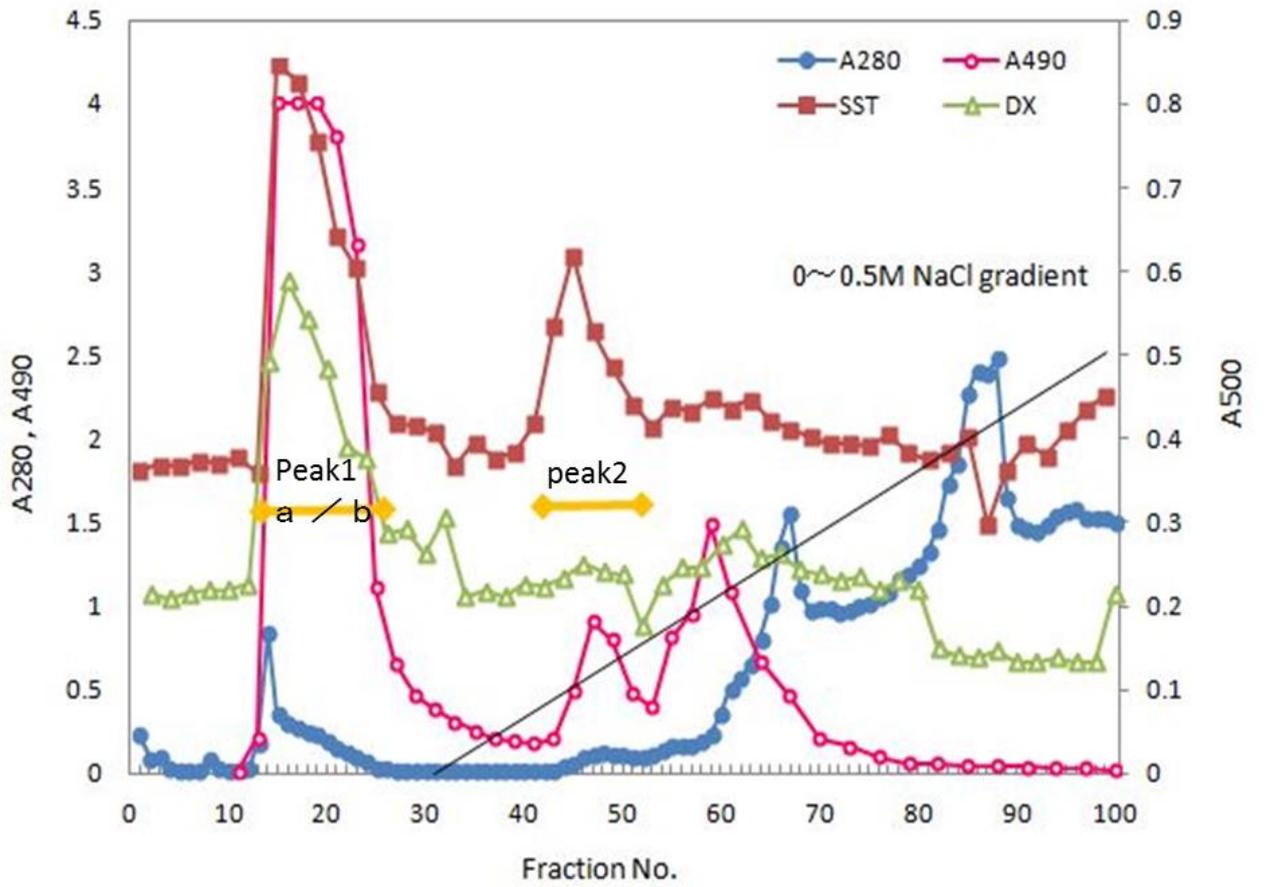


図 32. QAE-Toyopearl による分画(2)

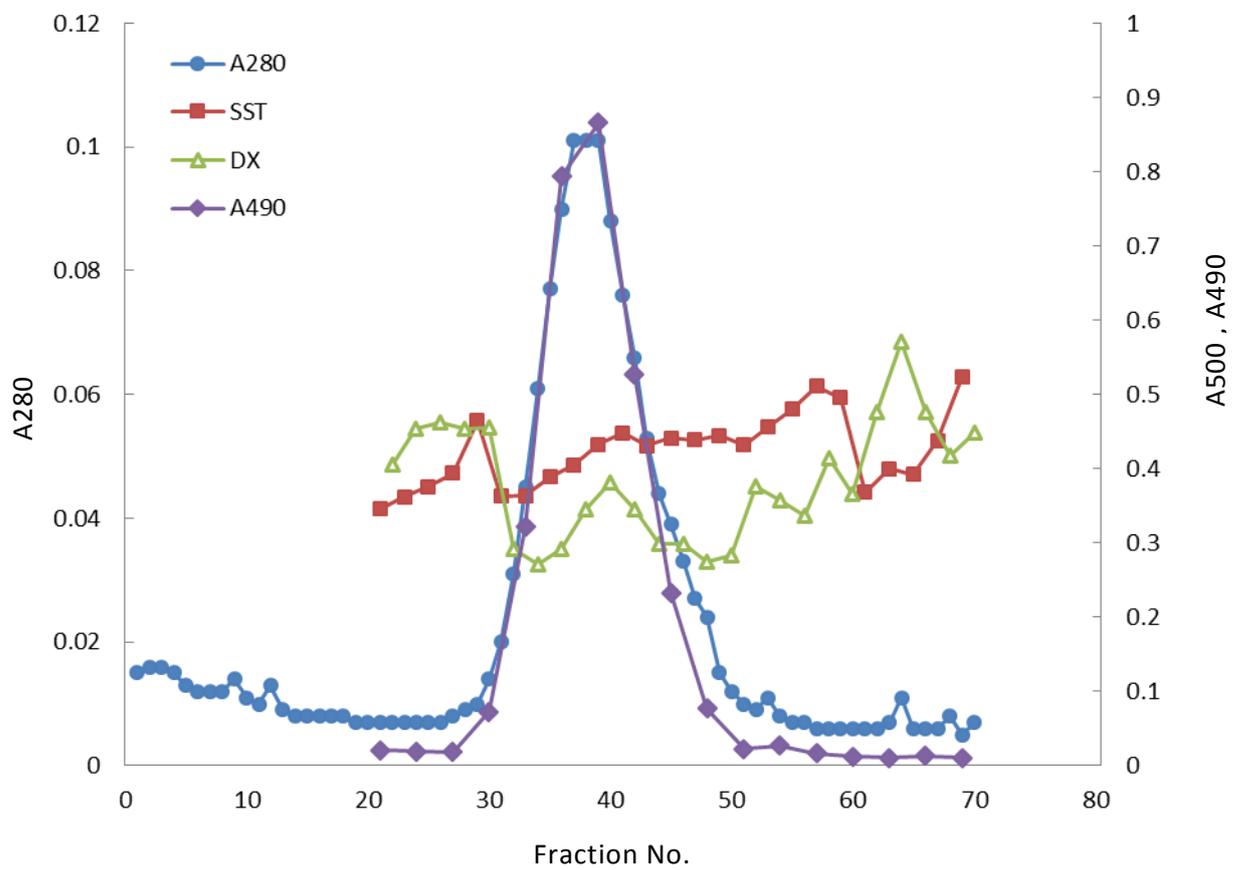


図 33. Sephacryl S-200 による分画(4) peak1-a

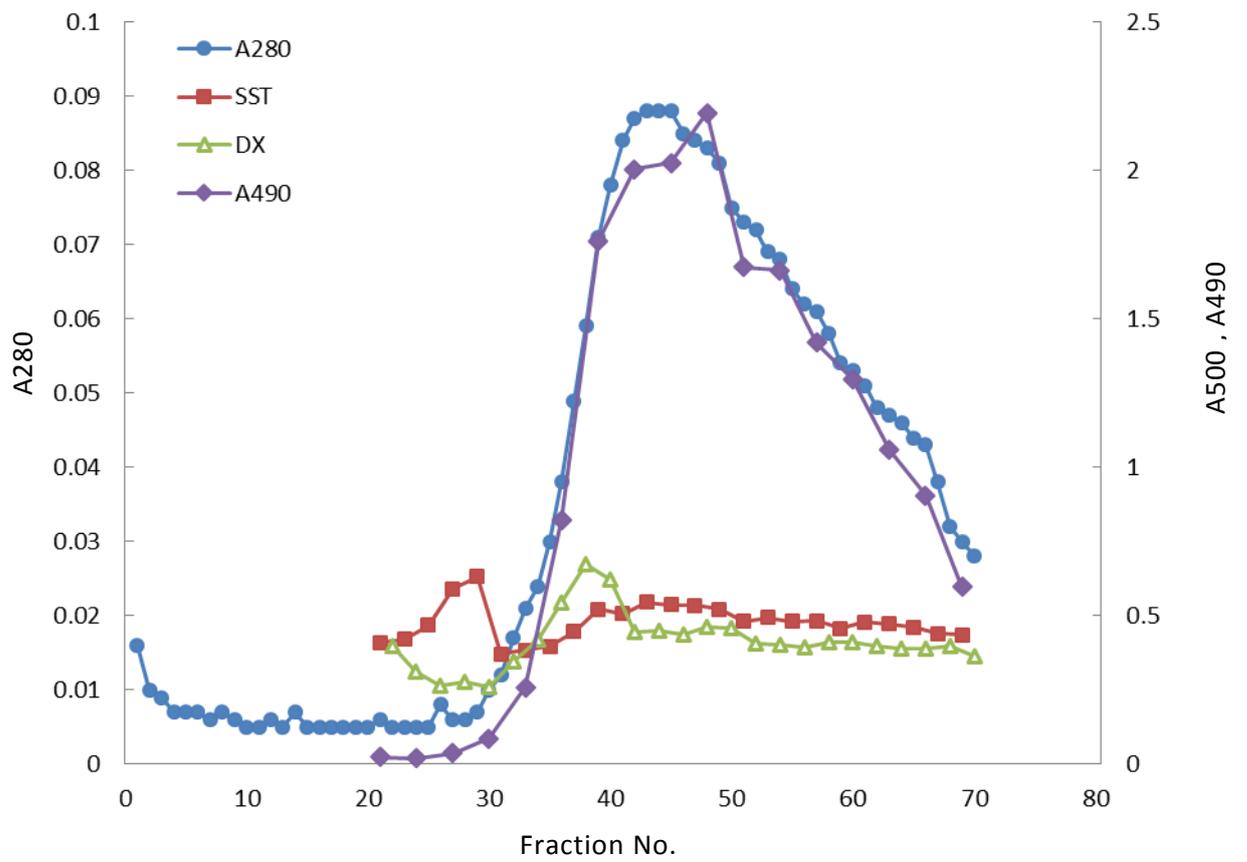


図 34. Sephacryl S-200 による分画(5) peak1-b

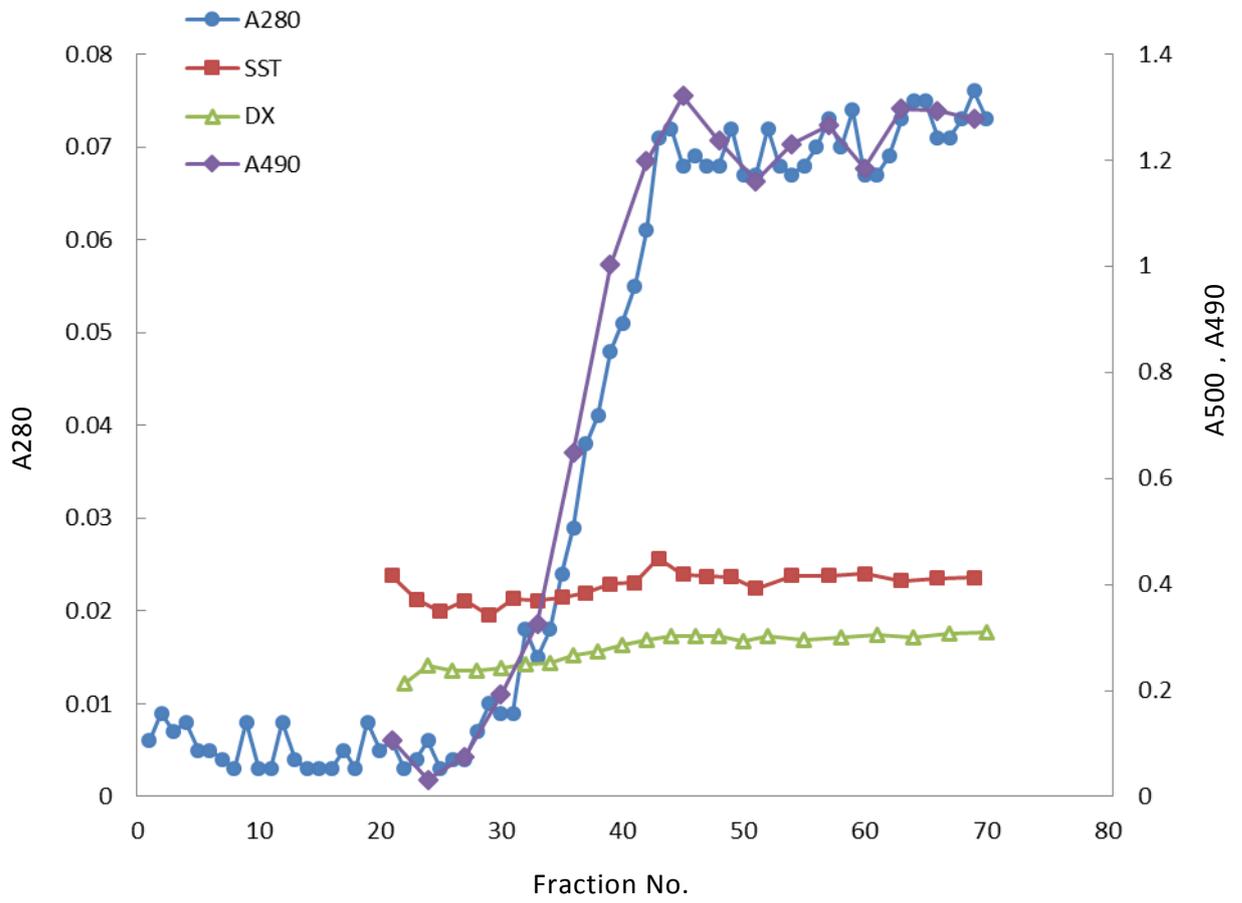


図 35. Sephacryl S-200 による分画(6) peak2

そこで、粗酵素の夾雑多糖を除去するためにホウ酸緩衝液を用いて粗酵素を溶解および透析処理後、唾液の $\alpha$ -アミラーゼによる前処理を行った試料について、QAE-Toyopearl カラムで分画を試みた。その結果、メインの活性ピークは素通りのフラクション #20 から 30 に溶出され、その他の夾雑タンパク質はカラムに吸着し、食塩を含んだ溶媒により後半部分に溶出された。前処理によってこれまで分離が困難であった夾雑多糖の影響も少なくなったため、活性画分を peak1 として回収、濃縮した(図 36)。#70 付近の高い SST に対する活性は前処理に用いた唾液  $\alpha$ -アミラーゼに由来するものと考えられる。

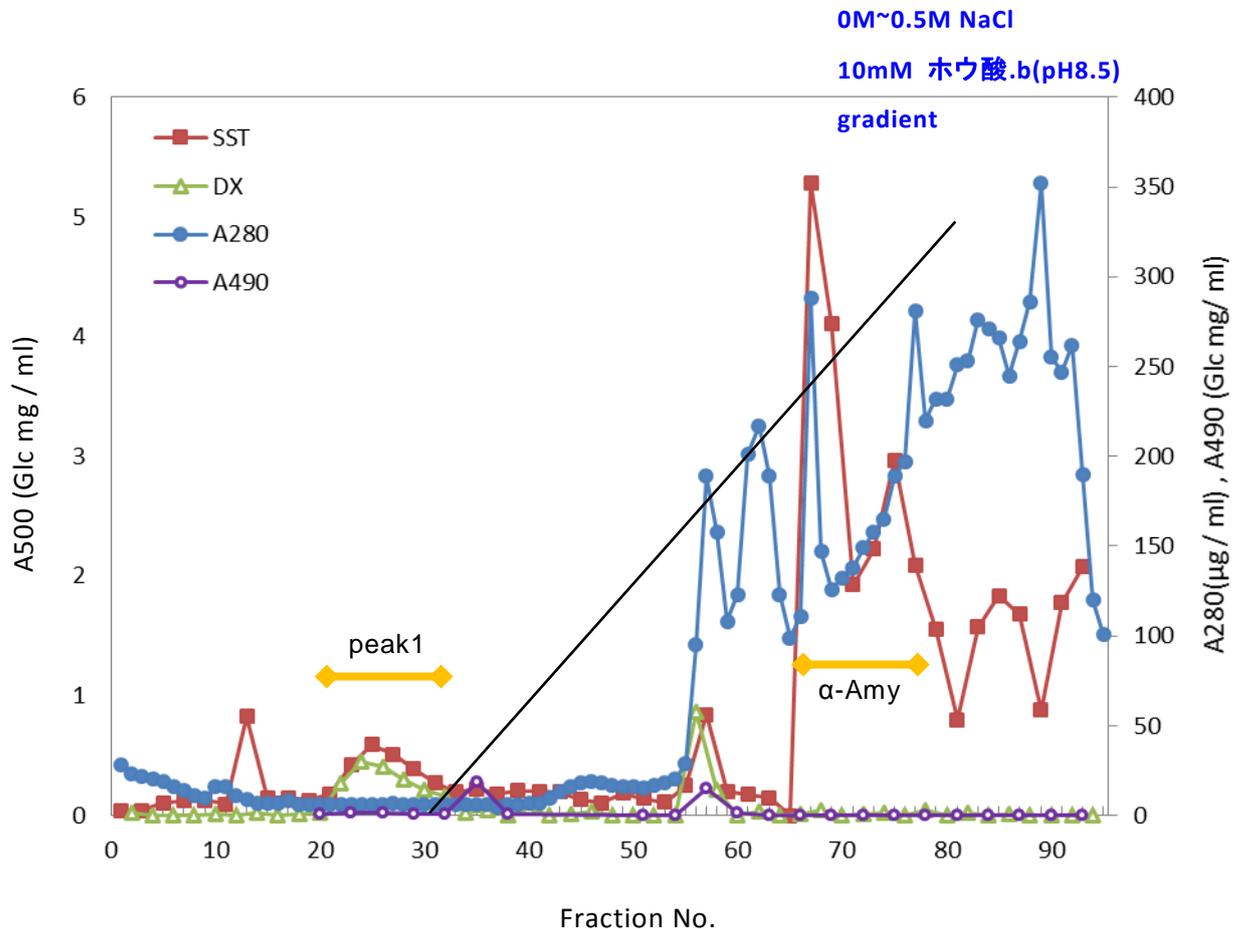


図 36. QAE-Toyopearl による分画(3)

集めた活性画分を Sephacryl S-200 カラムでゲルろ過した。メインの活性ピークはフラクション # 30 前後に検出され，基質 SST，DX に対して，ほぼ同等の活性を示した(図 37)。この活性画分を回収し，濃縮した。

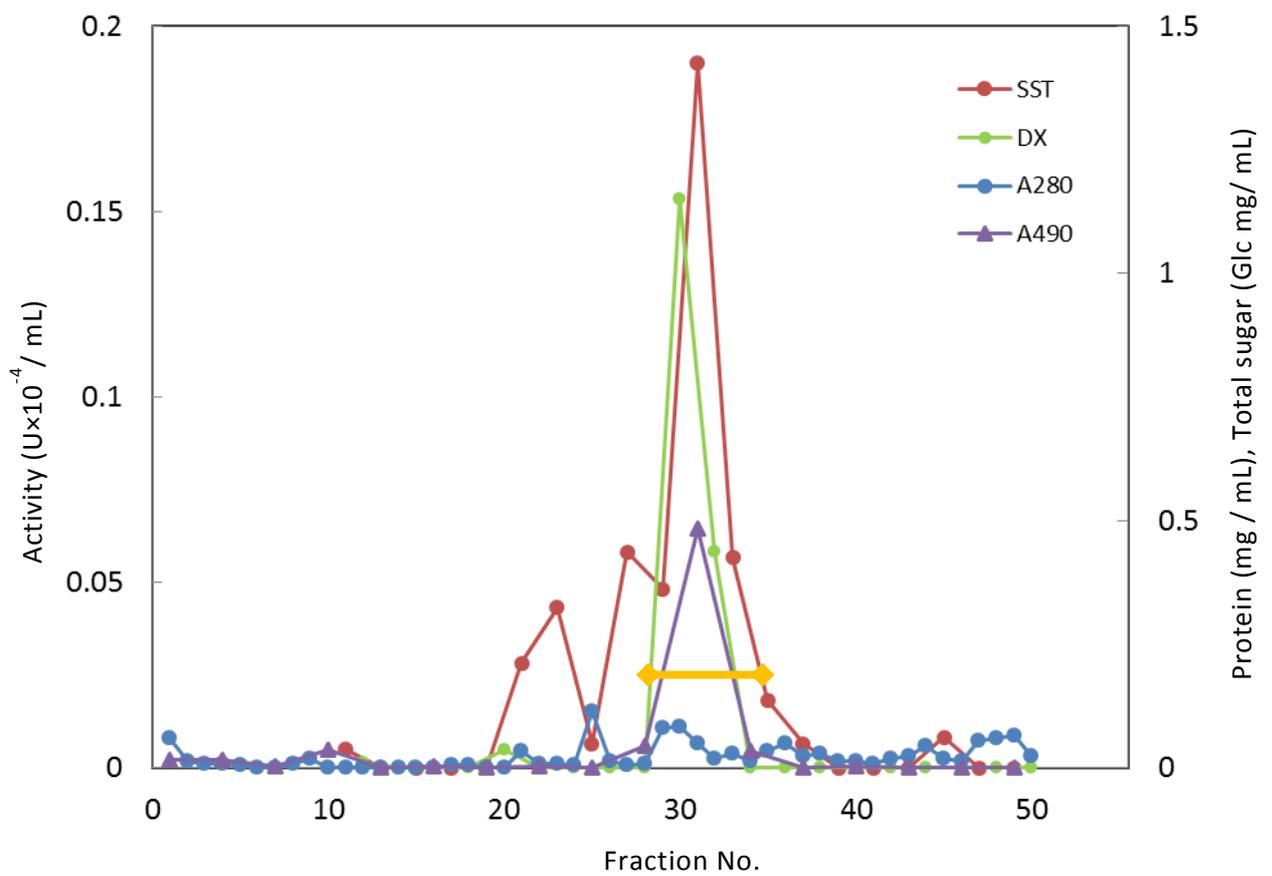


図 37. Sephacryl S-200 による分画(7)

## (2) 精製のまとめ

本酵素の精製の過程を表 2 にまとめた。この表では基質 SST と DX により測定した結果を別に表示した。G22-10 株由来の  $\alpha$ -グルカナーゼは両基質について活性収率 3% で、およそ 75 倍に精製された。基質 SST, DX の両方に同様に作用して還元糖を生成することがわかり、精製の各段階においても比活性の上昇の割合や、活性収率の値に基質の種類による大きな差は見られなかった。このことから、この酵素は  $\alpha$ -1,4 結合型、 $\alpha$ -1,6 結合型の 2 種の基質に対して同等の作用を示すことが明らかになった。酵素の純度を上げるために、QAE-Toyopearl カラムから Sephacryl S-200 カラムで精製をしたが、比活性がほぼ 2 分の 1 程度に低下してしまった。これは、酵素の失活が大きかったために最終的に比活性の低下を生じたものと推測された。

表 2 G22-10 株由来の酵素の精製

a) Soluble starch as the substrate

	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)	Fold
Culture Supernatant	240	125	0.52	100	1
$\alpha$ -アミラーゼ digest	215	402	1.87	(322)	3.4
QAE-Toyopearl	0.7	66	94	53	181
Sephacryl S-200	0.1	4	40	3	77

b) Dextran as the substrate

	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)	Fold
Culture Supernatant	240	80	0.33	100	1
$\alpha$ -アミラーゼ digest	215	193	0.9	(241)	2.7
QAE-Toyopearl	0.7	40	57	50	172
Sephacryl S-200	0.1	2.4	24	3	73

(3) 純度検定

次に、先の Sephacryl S-200 カラムで得られた活性画分を濃縮し、**SDS-PAGE** により分析した。銀染色により精製酵素は単一のタンパク質バンドを与えた(図 38, 矢印の位置)。また、このタンパク質は検量線より分子量 52 kDa と測定された(図 39)。この結果は本酵素が 2 つの基質に作用できる単一タンパク質であることを示している。

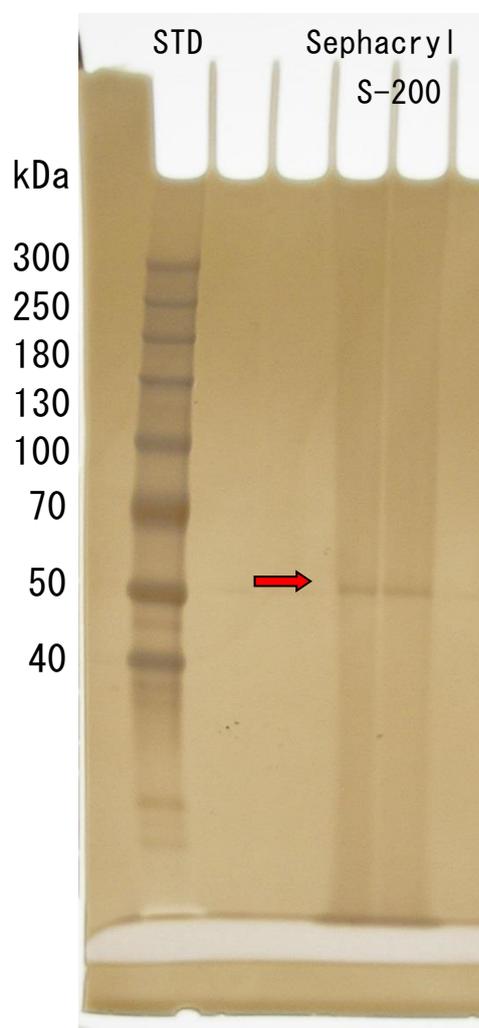


図 38. 精製酵素の SDS-PAGE

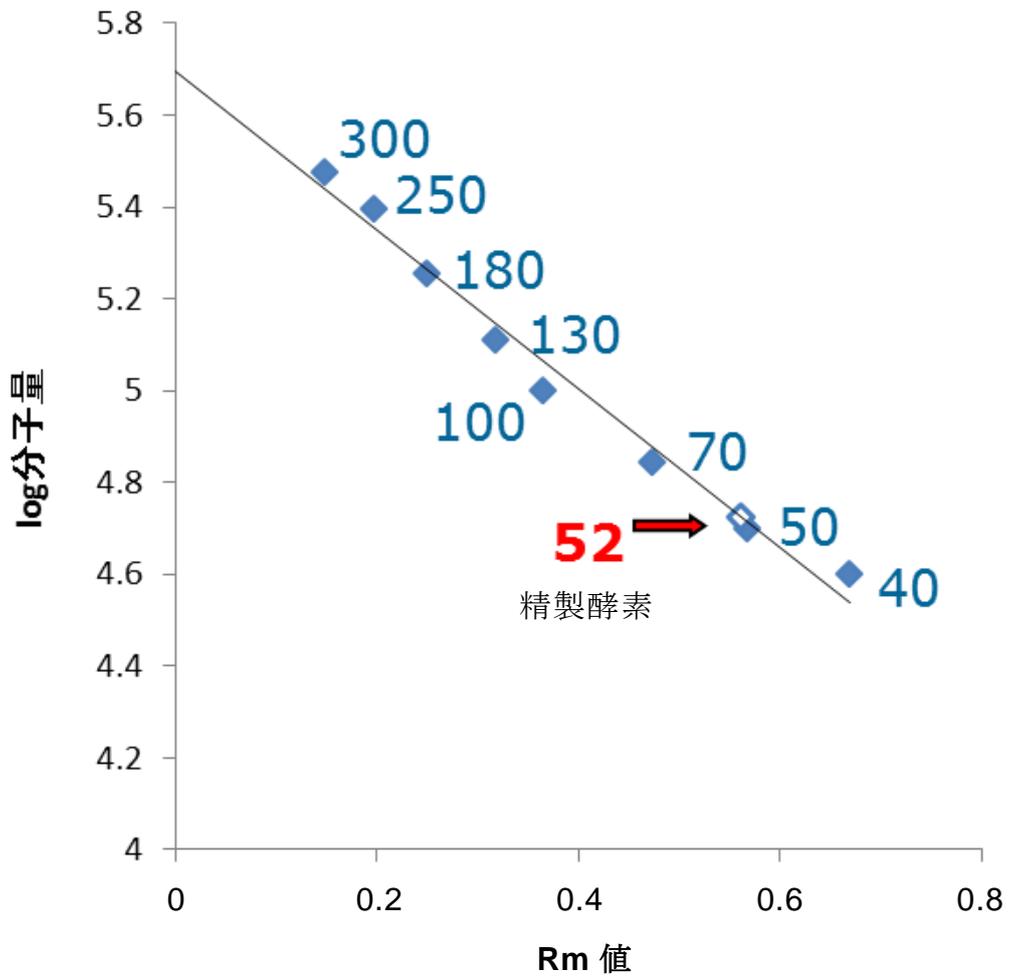


図 39. SDS-PAGE 検量線

## 6. $\alpha$ -グルカナーゼの一般的な性質

これまでの結果から、本酵素は $\alpha$ -1,4結合型の基質からはマルトオリゴ糖を生成し、 $\alpha$ -1,6結合型の基質へ作用させた場合にも $\alpha$ -1,4結合型のマルトオリゴ糖などを生成することが明らかになった。いずれの基質を用いたときも、生成物が極めて類似したオリゴ糖組成のものであることが認められた。従って、本酵素は $\alpha$ -1,4結合型の基質にも $\alpha$ -1,6結合型の基質にも作用することから、これ以降の説明ではアミラーゼとデキストラナーゼの性質をあわせ持つ $\alpha$ -グルカナーゼと呼ぶことにした。

以下に一般的な酵素化学的性質について測定した結果を述べる。

### (1) 最適作用 pH, pH 安定性

本酵素について最適作用 pH および pH 安定性を検討した(図 40, 図 41)。基質 SST, DX にともに作用し、最適作用 pH はいずれも pH 7.5 付近であり、pH 6.5 から 7.5 の範囲で安定だった。

### (2) 最適作用温度, 温度安定性

最適作用温度および温度安定性を検討した(図 42, 図 43)。基質の SST, DX の測定とともに最適作用温度は 30°C であり、15°C から 30°C 付近までは 80 % 程度の活性を保持したが、それ以上になると急激に活性は失われた。

### (3) 阻害剤による影響

本酵素に対する各種重金属および化学修飾試薬による阻害の影響を検討した(図 44)。基質 SST では硝酸コバルト, 硫酸マグネシウム, 塩化カルシウムで賦活作用が見られ, 硫酸銅, 硫酸第一鉄では顕著に活性が阻害された。基質 DX では, 塩化カルシウム, DTT で若干の賦活作用が見られ, EDTA で最も活性は阻害された。塩化カルシウムの添加により酵素活性が上昇するのは, 親株である T-3040 株の CITase と同様であり, G22-10 株の  $\alpha$ -グルカナーゼでも類似の性質が見られた。

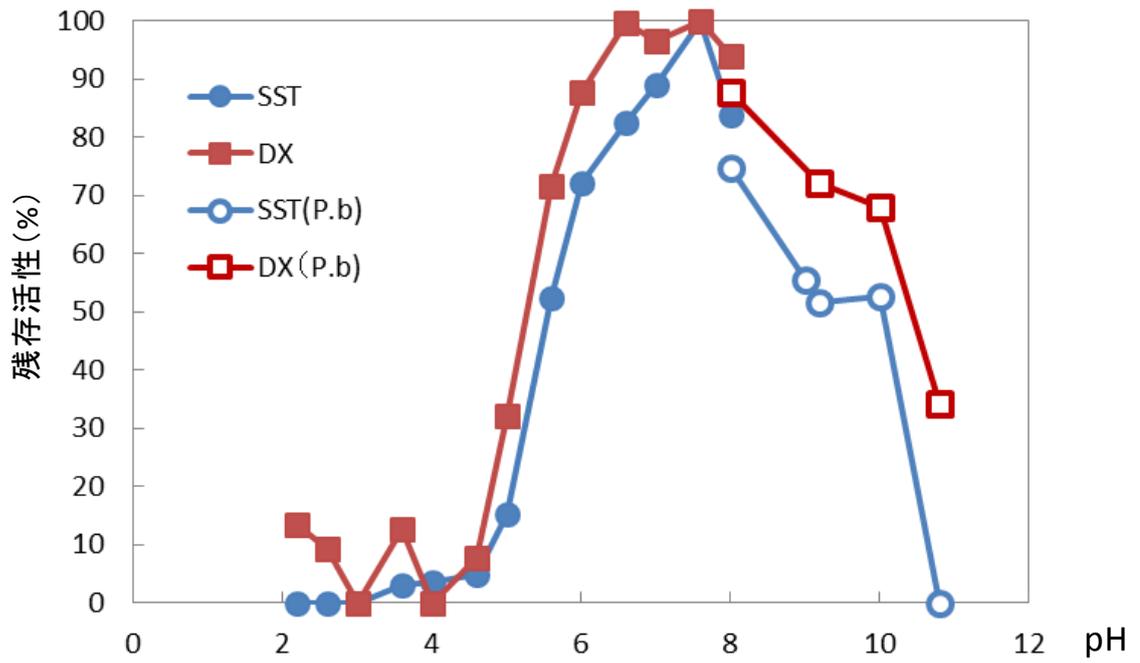


图 40. 最適作用 pH

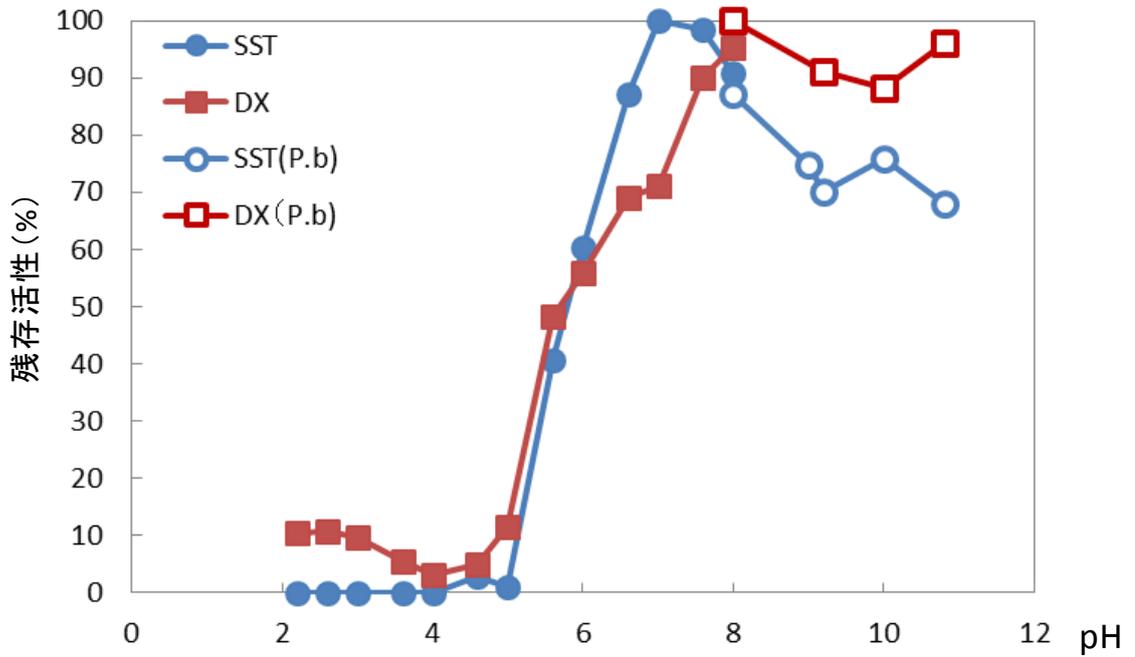


图 41. pH 安定性

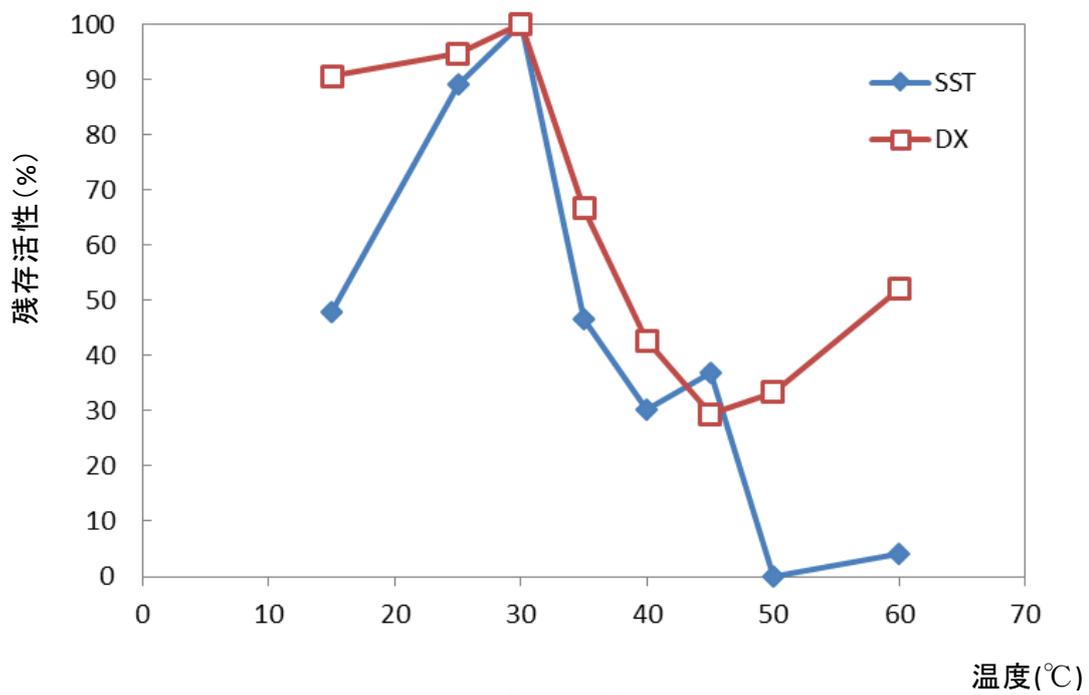


图 42. 最適作用温度

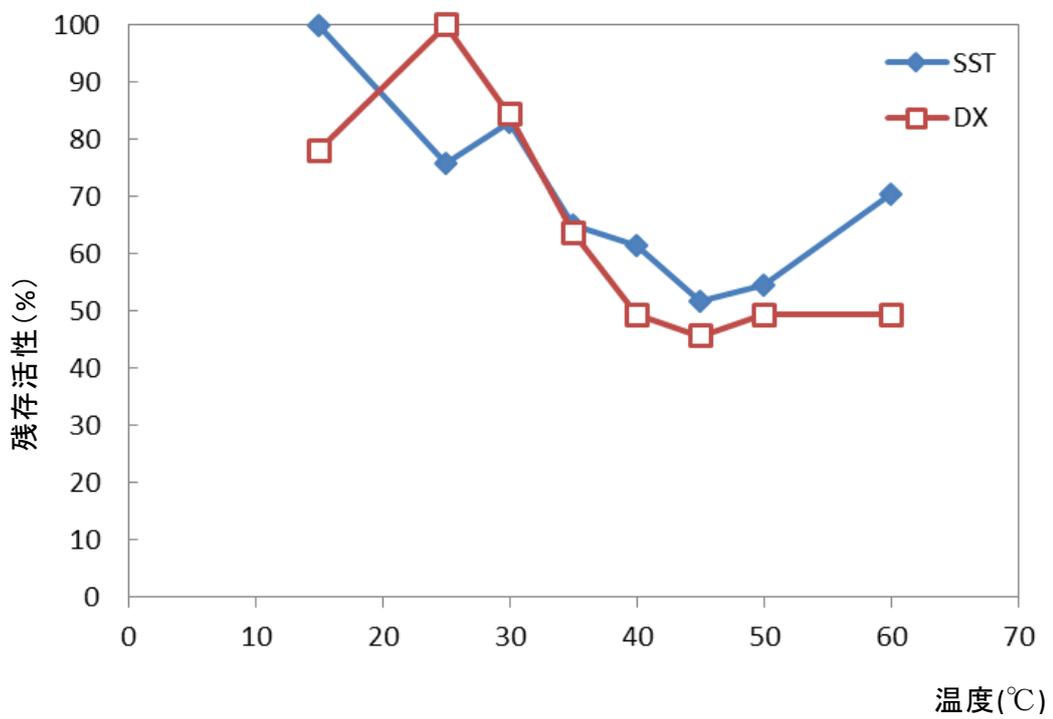


图 43. 温度安定性

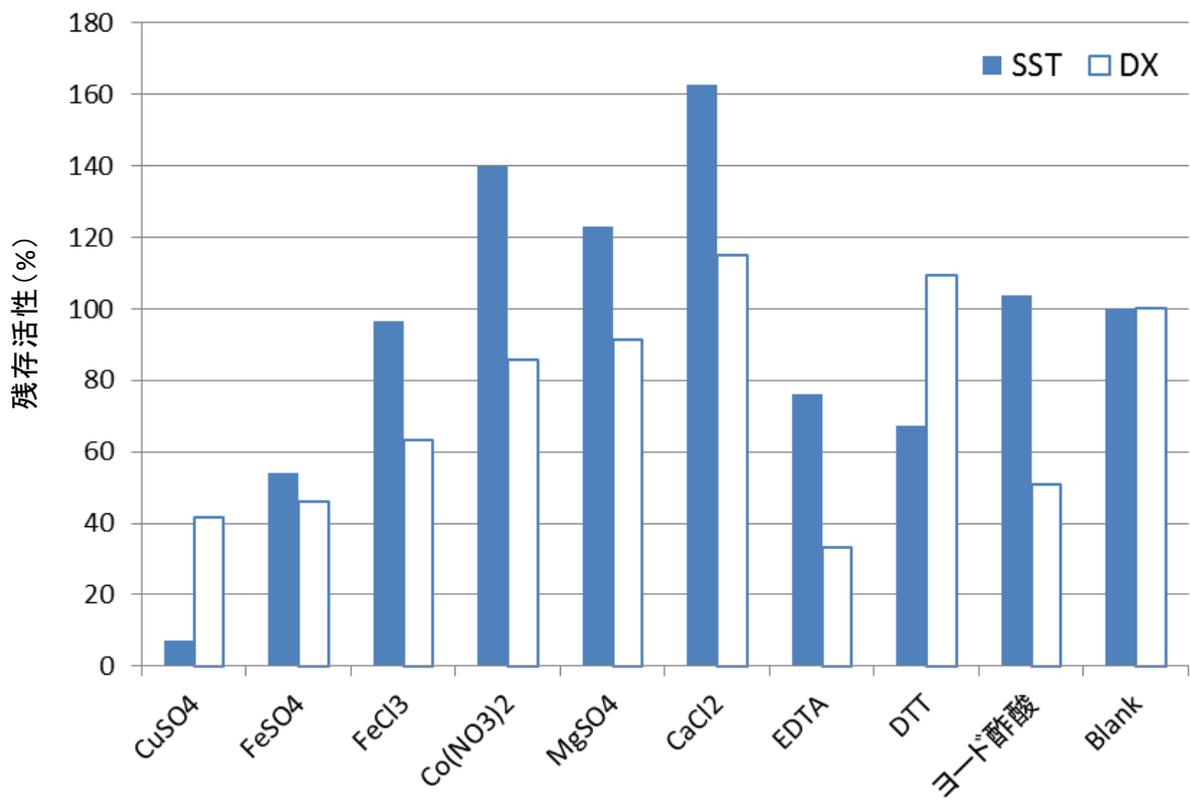


図 44. 阻害剤による影響

## 7. $\alpha$ -グルカナーゼの基質特異性の解析

### (1) 各種基質への作用

$\alpha$ -1,4 結合型 (SST, M6,  $\gamma$ -CD),  $\alpha$ -1,6 結合型 (DX, IM6, CI-8)の6種類の糖を基質として精製酵素を用いて反応性および反応生成物について検討した。生成還元糖量を測定した結果、基質の種類にかかわらず、すべての基質で還元糖の生成が見られ、分解率はそれぞれ SST ; 9.6 %, DX ; 8.0 %, M6 ; 7.2 %, IM6 ; 9.6 %,  $\gamma$ -CD ; 8.0 %, CI-8 ; 4.8 %となり、多糖、オリゴ糖、環状オリゴ糖いずれに対しても実験条件では10%程度の分解率が得られた(表3)。ただしCI-8に対しては分解率がやや低かった。 $\alpha$ -1,4結合型と $\alpha$ -1,6結合型の基質を比較すると、多糖SST, DXでは若干 $\alpha$ -1,4結合型のほうが高い値を示したが、ほぼ同程度だった。しかし、オリゴ糖、環状オリゴ糖ではこの傾向があてはまらず、基質の種類によって分解率が異なっていた。このように、精製酵素を用いた実験でも $\alpha$ -1,4結合型と $\alpha$ -1,6結合型の基質に作用することが分かったため、G22-10株では異なる2種の酵素が混在しているのではなく、単一の酵素が両基質に作用していることが明らかになった。

次に、この反応生成物をHPLCにより分析した(図45)。標準糖(STD)およびblankのチャートは別に示した(図46)。すべての基質が精製酵素で加水分解され、生成物としてグルコース(Glc)のピーク(ピーク1)が検出された。特にSSTは基質の低分子化が見られ、Glcのほかにマルトース(M2, ピーク2), マルトトリオース(M3, ピーク3)などのマルトオリゴ糖のピークが多数見られた。基質としたM6(ピーク4)でも同様に基質が低分子化され、Glc, M2, M3などのピークが検出された。 $\alpha$ -1,6結合型の基質であるDXでは、GlcのピークのほかにM2, M3と見られるピークが検出され、 $\alpha$ -1,6結合型の基質から、 $\alpha$ -1,4結合のオリゴ糖が検出された。IM6(ピーク5)の分解物でDXと同様に、Glc, M2, M3のピークが検出された。これらの3つの生成物のピークは図45から明らかなように、どの基質を用いた場合にも共通して認められ、各ピークの生成比率も極めて類似していることは大変興味深い。さらに $\gamma$ -CD(ピーク6), CI-8(ピーク7)に作用させた結果でも、Glcのほかにマルトオリゴ糖が生成されていた。また、これらの環状オリゴ糖を分解することから本酵素はエンド型の作用を持つことが分かった。基質として用いた糖よりも重合度の高いオリゴ糖のピーク(図45, 図中の丸印および矢印で示した部分)も見られることから本酵素は両結合を加水分解するだけでなく転移反応によって新たに $\alpha$ -1,4,  $\alpha$ -1,6結合を生成する作用を有することが推察された。

表 3.  $\alpha$ -グルカナーゼによる各種基質に対する分解率 DH(%)

	SST	9.6
$\alpha$ -1,4 結合型	maltohexaose(M6)	7.2
	$\gamma$ -CD	8.0
	DX	8.0
$\alpha$ -1,6 結合型	isomaltohexaose(IM6)	9.6
	CI-8	4.8

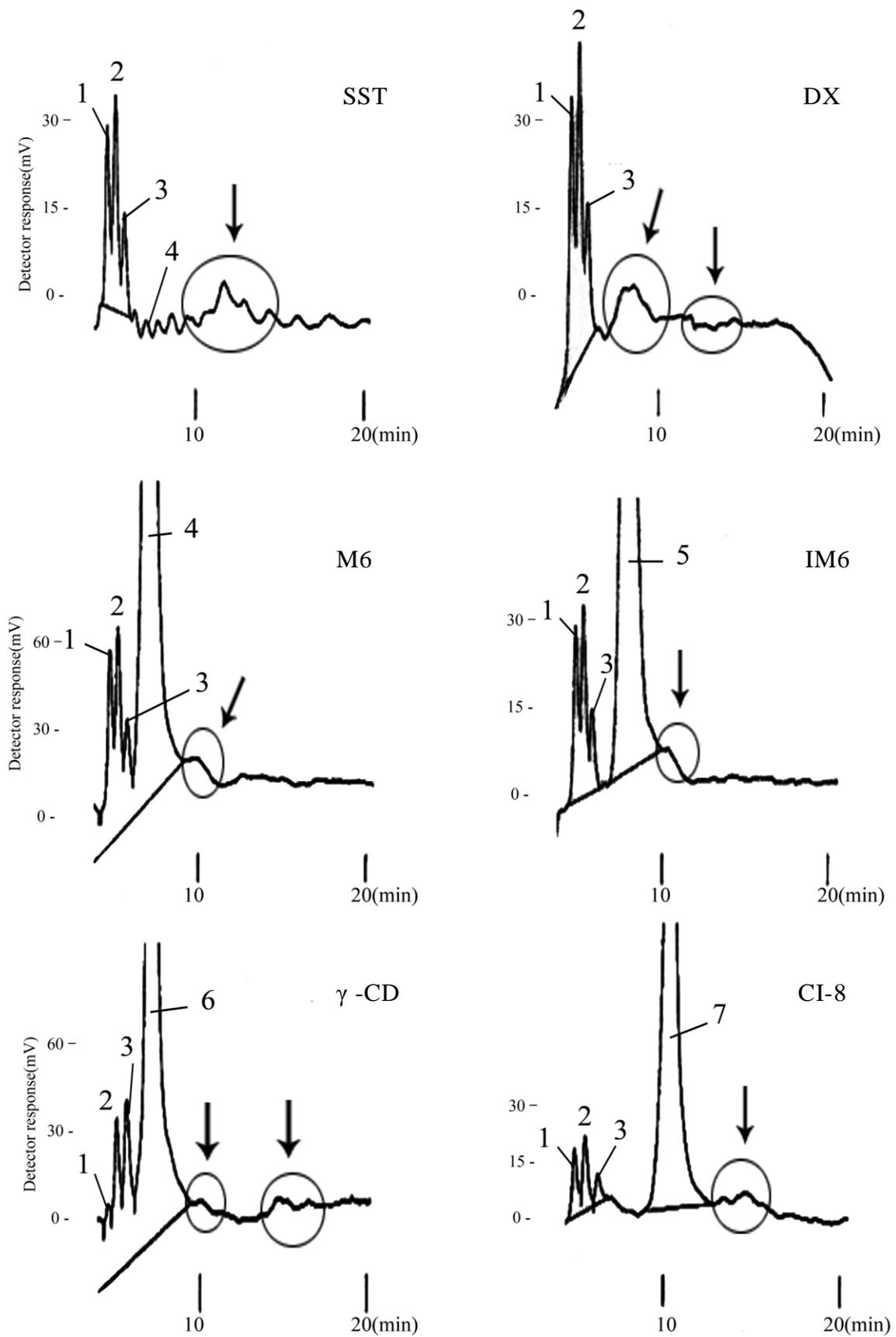


図 45. 精製酵素の各種基質への作用

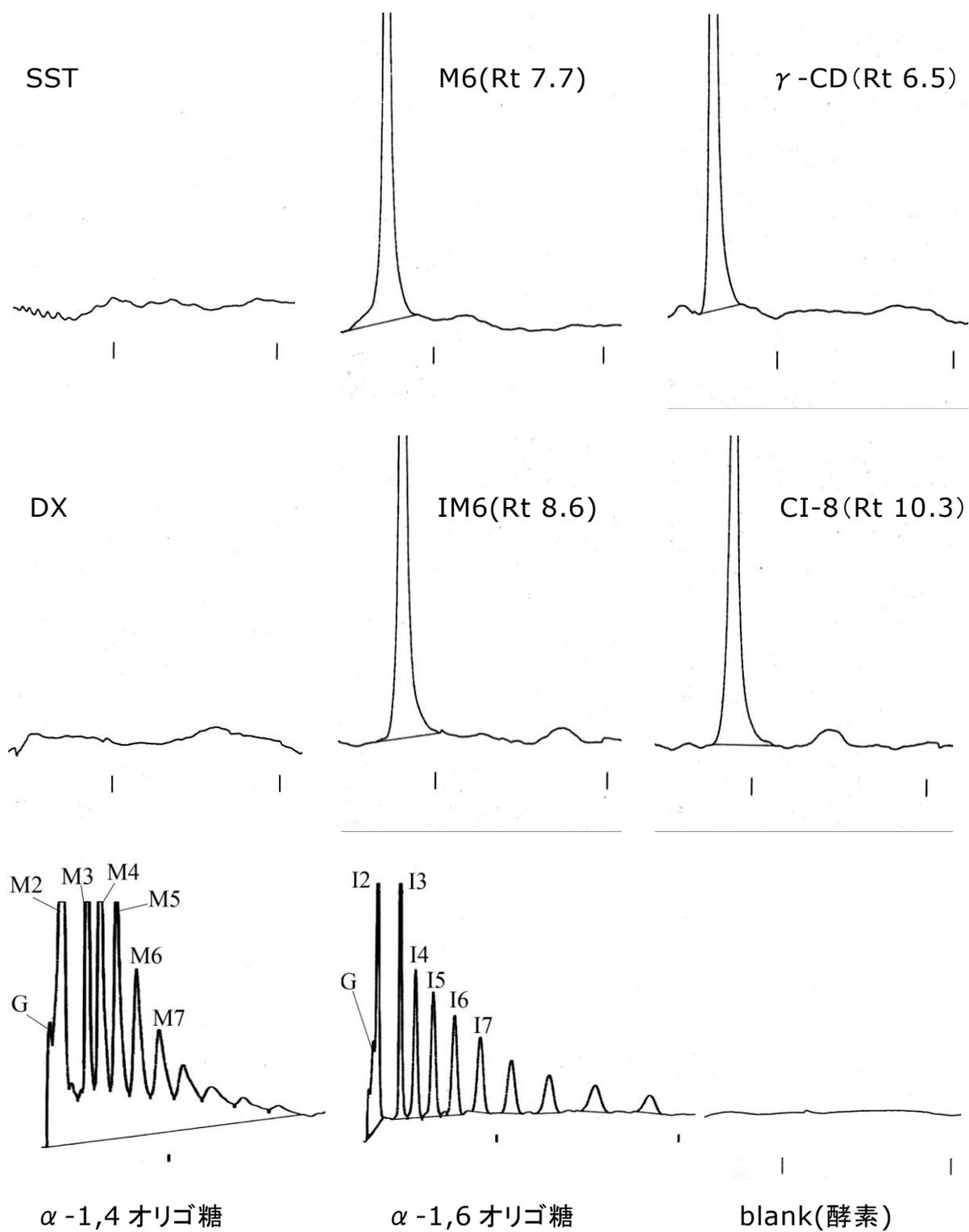


図 46. 基質および blank の溶出時間 (Rt)

## (2)基質特異性

次に、 $\alpha$ -1,4 結合型および  $\alpha$ -1,6 結合型の種々の基質と反応させ、その作用性を比較した。その結果、 $\alpha$ -1,4 結合型の基質の多糖ではグルコース鎖の長さに関わらず還元力を生成する強い活性が見られたが、オリゴ糖の FG67 は多糖に比べ活性が小さかった(図 47)。 $\alpha$ -1,6 結合型の基質では、DX の重合度による分子量の違いで比較したが、分子量 10 k および 500 k のもので強い還元力を示し、70 k の還元力は 10 k の 3 分の 2 程度だった(図 48)。このように基質多糖の分子量の差により、本酵素の活性にも差を生じていることが分かった。

## (3) $K_m$ および $V_{max}$

基質 DX について、Lineweaver & Burk's plot から  $K_m$ ,  $V_{max}$  を求めた結果を示した(図 49)。3 種類の基質 DX, SST, FG67 について測定をした結果(表 4)を見ると、本酵素は  $\alpha$ -1,6 結合型と  $\alpha$ -1,4 結合型に同等の親和性があると考えられる。また  $V_{max}$  で見ると、DX が最も高い値を示しており、 $\alpha$ -1,4 結合型の SST, FG67 に対するよりもかなり活性が強いことが分かった。

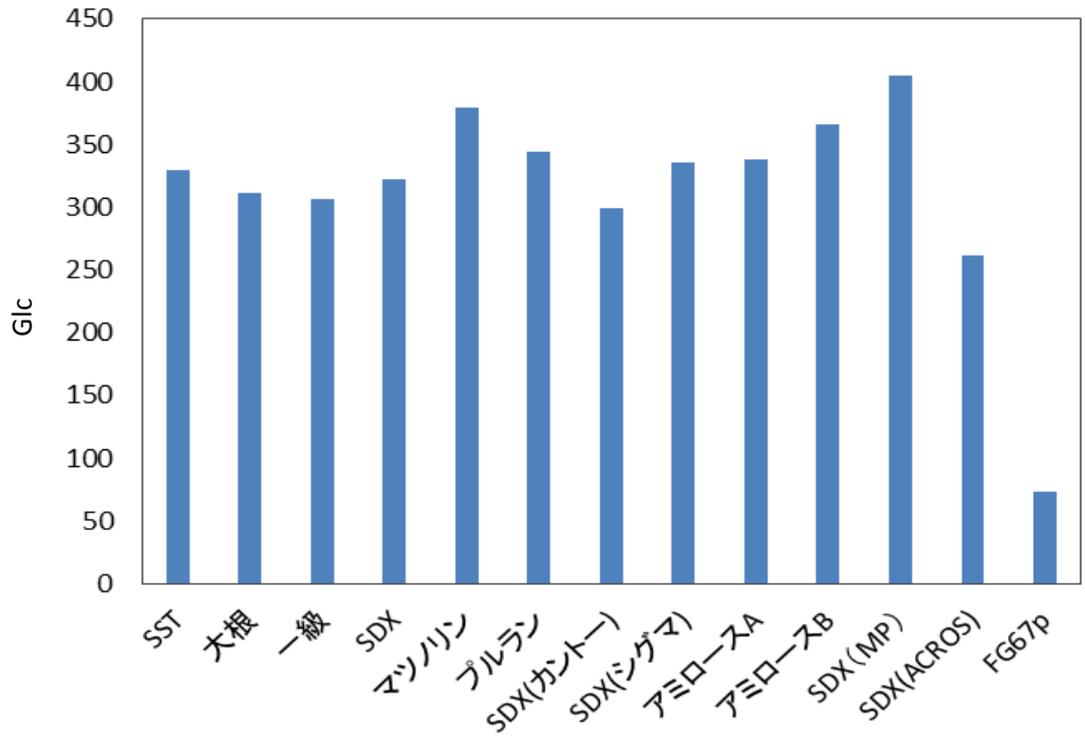


図 47. 基質特異性  $\alpha$ -1,4 結合型の比較

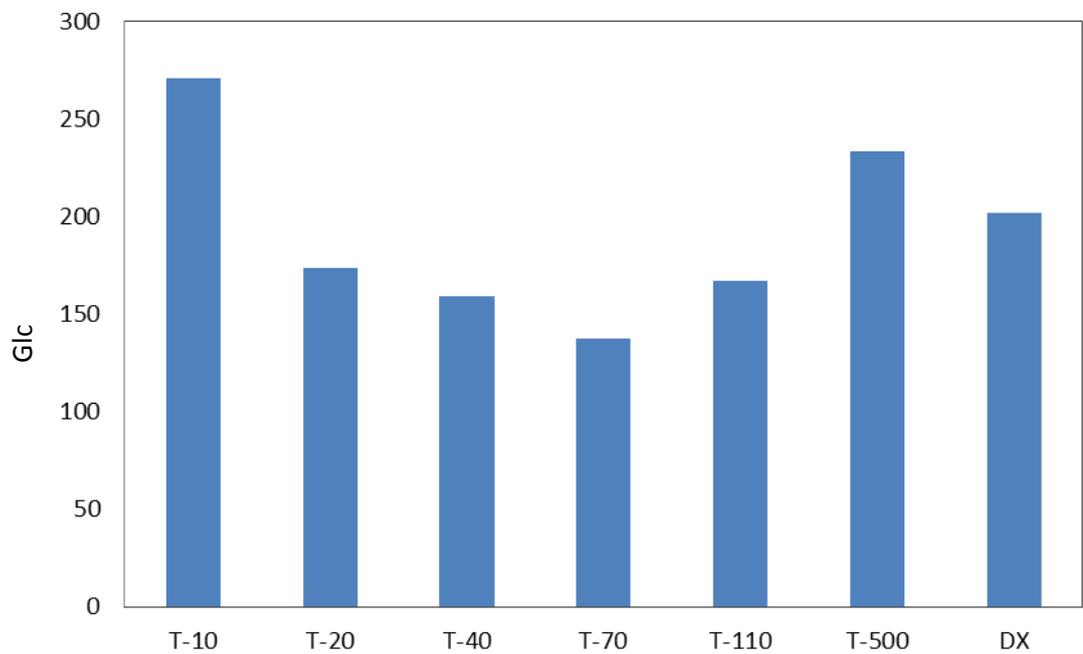


図 48. 基質特異性  $\alpha$ -1,6 結合型の比較

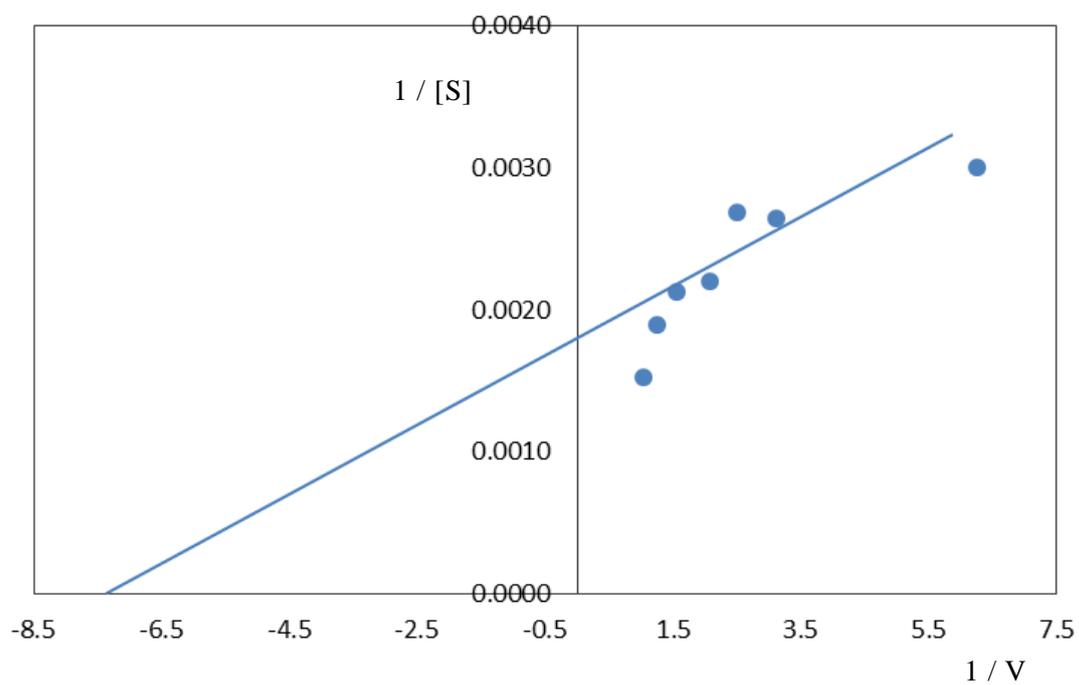


図 49. Lineweaver & Burk's plot (DX)

表 4.  $K_m$  および  $V_{max}$

	$K_m(\text{mM})$	$V_{max}$ ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ )
SST	0.09	303
DX	0.1	588
FG67p	0.06	105

## 8. $\alpha$ -グルカナーゼの反応生成物の解析

### (1) 反応生成物の分子量測定

反応生成物の組成を分析するために、凍結粗酵素を透析した上清を Sephacryl S-200 カラムで分画し、先の Sephacryl S-200(1)(図 7)と同様に 2 つの活性ピークが検出された。得られた活性 peak を溶出順に P1~P3 として回収し、PVP 濃縮した(図 50)。

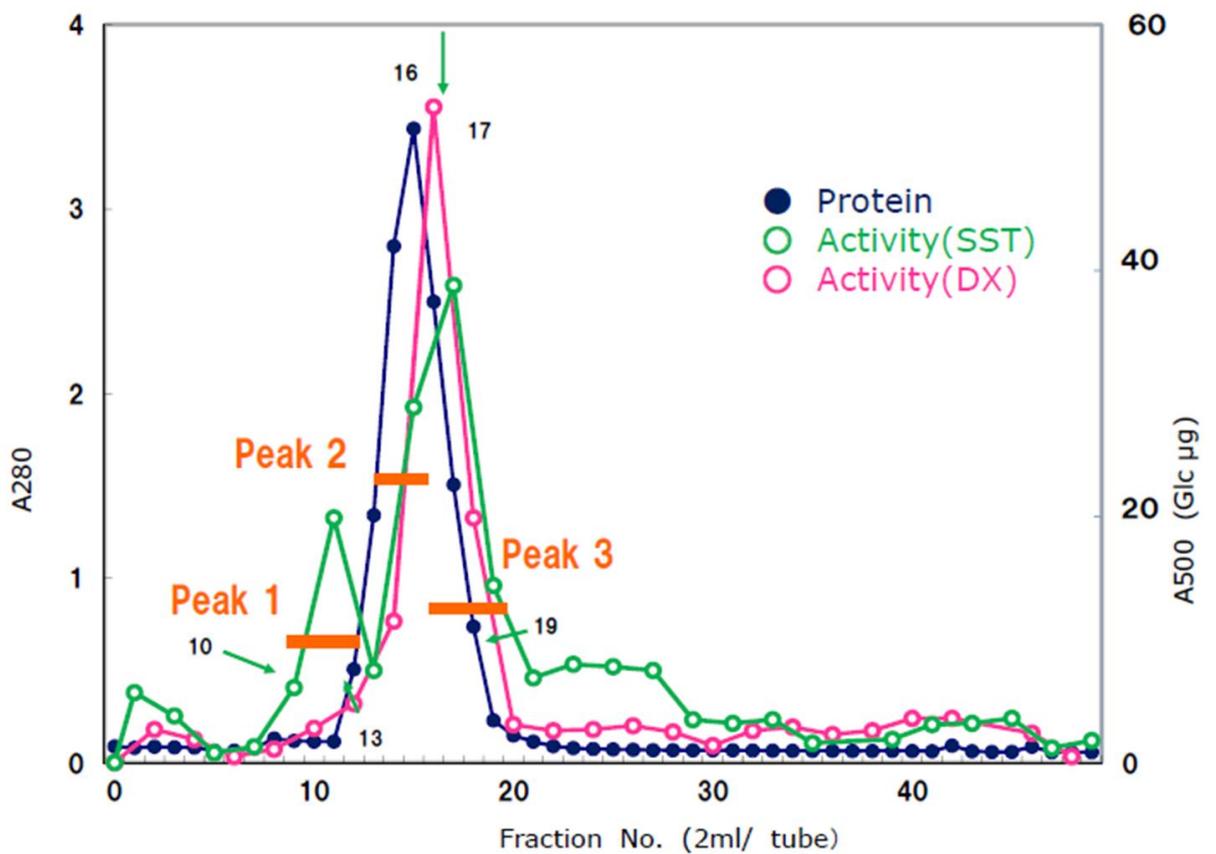


図 50. Sephacryl S-200 カラムによる分画(8)

Sephacryl S-200 カラム(8)で得られた活性画分の peak1 から 3 と基質の 2% FG67 を反応させて調製した反応生成物を Sephadex G-25 カラムで分画し、全糖量を測定した(図 51)。標準糖(STD)として使用した FG67 は 6 糖と 7 糖を主成分とする糖であり、peak2~3 の位置に溶出されている。一方、反応生成物では、基質の 6, 7 糖よりも前の位置に大きい peak が見られたことから、本酵素は基質よりも重合度の高い糖を生成していることが分かった。この高分子の反応生成物を peak1 として回収し、以降の実験に用いた。

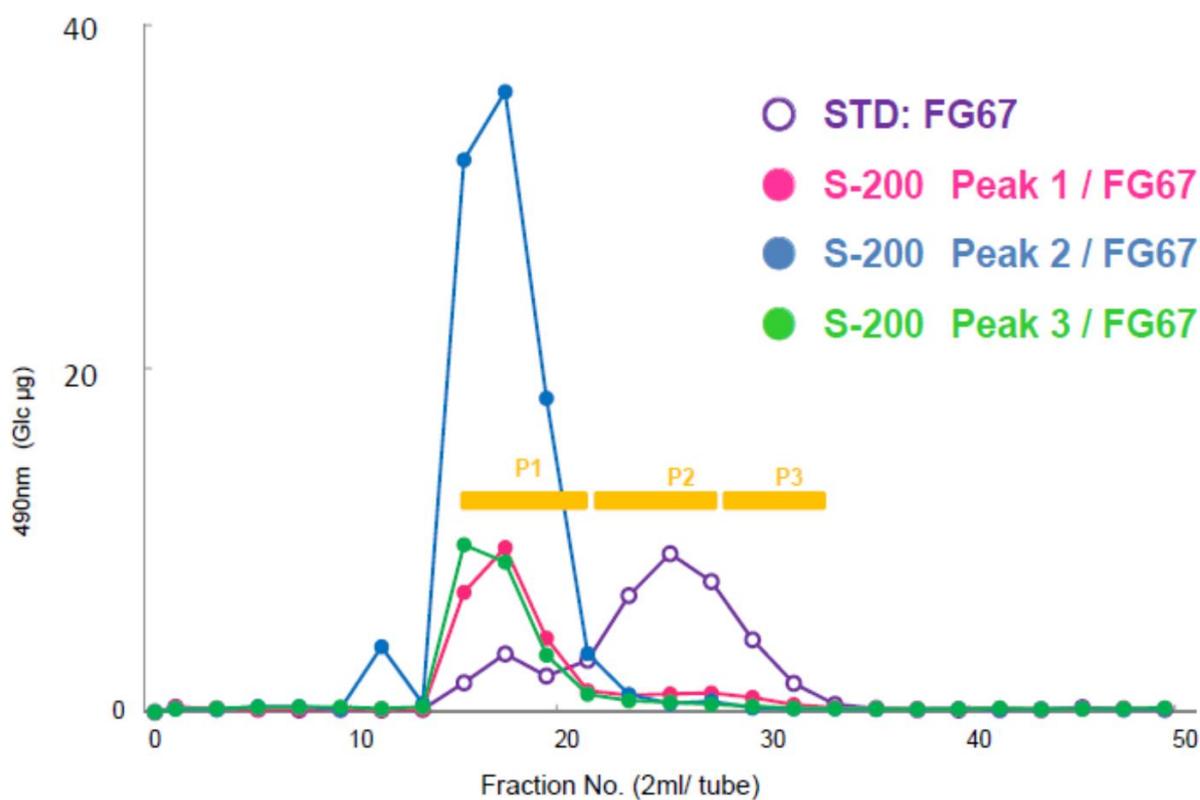


図 51. Sephadex G-25 による分画

この Sephadex G-25 カラムで分離・回収した高分子の反応生成物(P1)の分子量を、Toyopearl HW-55 カラムで測定した。標準糖(STD)として溶出した分子量 11 万のデキストラン+グルコース (青), 同じく分子量約 2 万のデキストラン+グルコース (桃) と比較すると, 反応生成物 (緑) の分子量は約 2 万に相当することが分かった(図 52)。

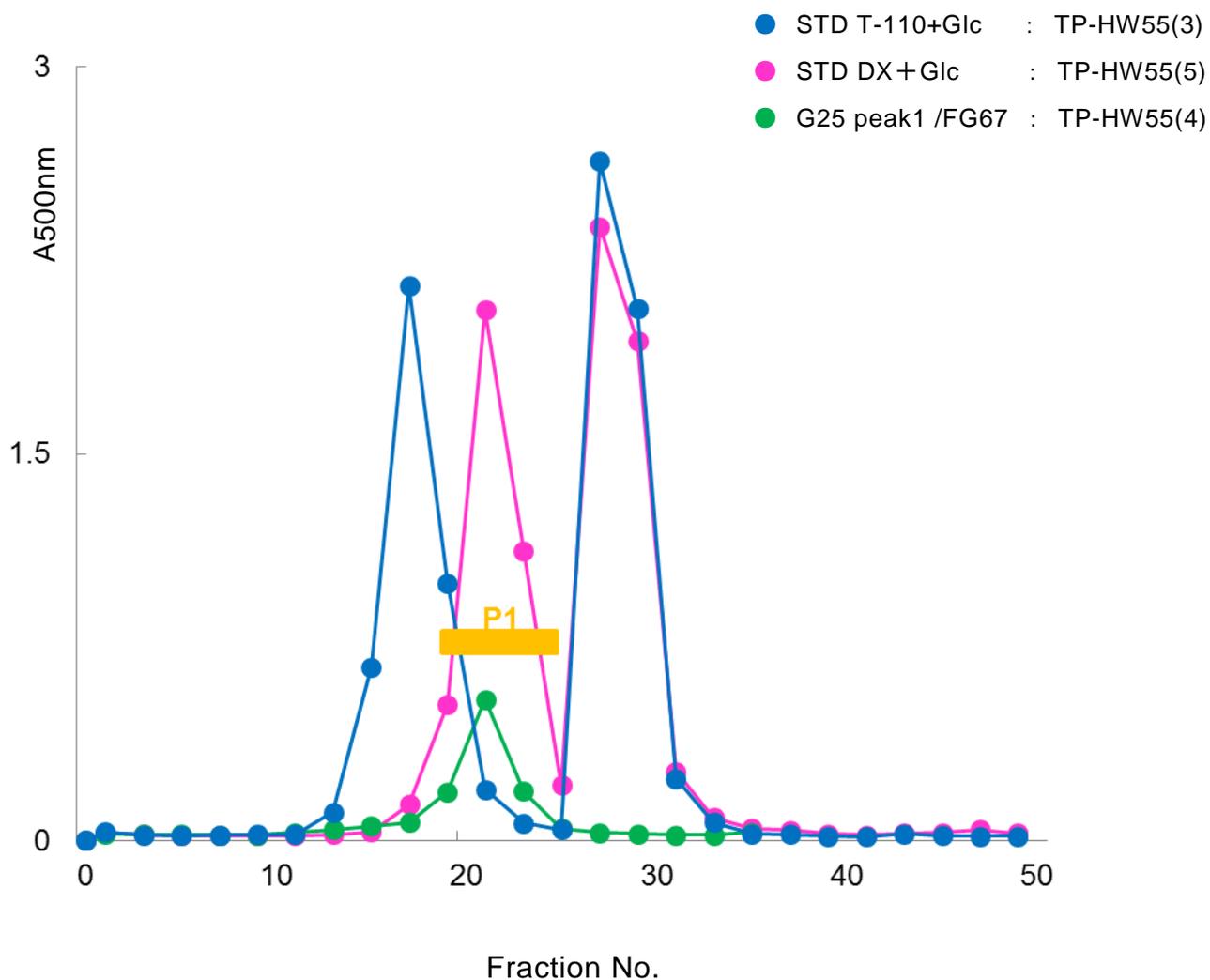


図 52. Toyopearl HW-55 による分画

FG67 から生成した高分子量の反応生成物を簡便に測定する方法についてエタノール沈殿法と限外ろ過膜法で検討した。エタノール沈殿法では、2% デキストランと FG67, それぞれ 1 ml に対して各種濃度のエタノールを加えて遠心分離し、回収した沈殿中の全糖量をフェノール硫酸法で測定し、グラフに表した。その結果、DX, FG67 ともにエタノール 75% でほぼ沈殿することが分かった (図 53)。

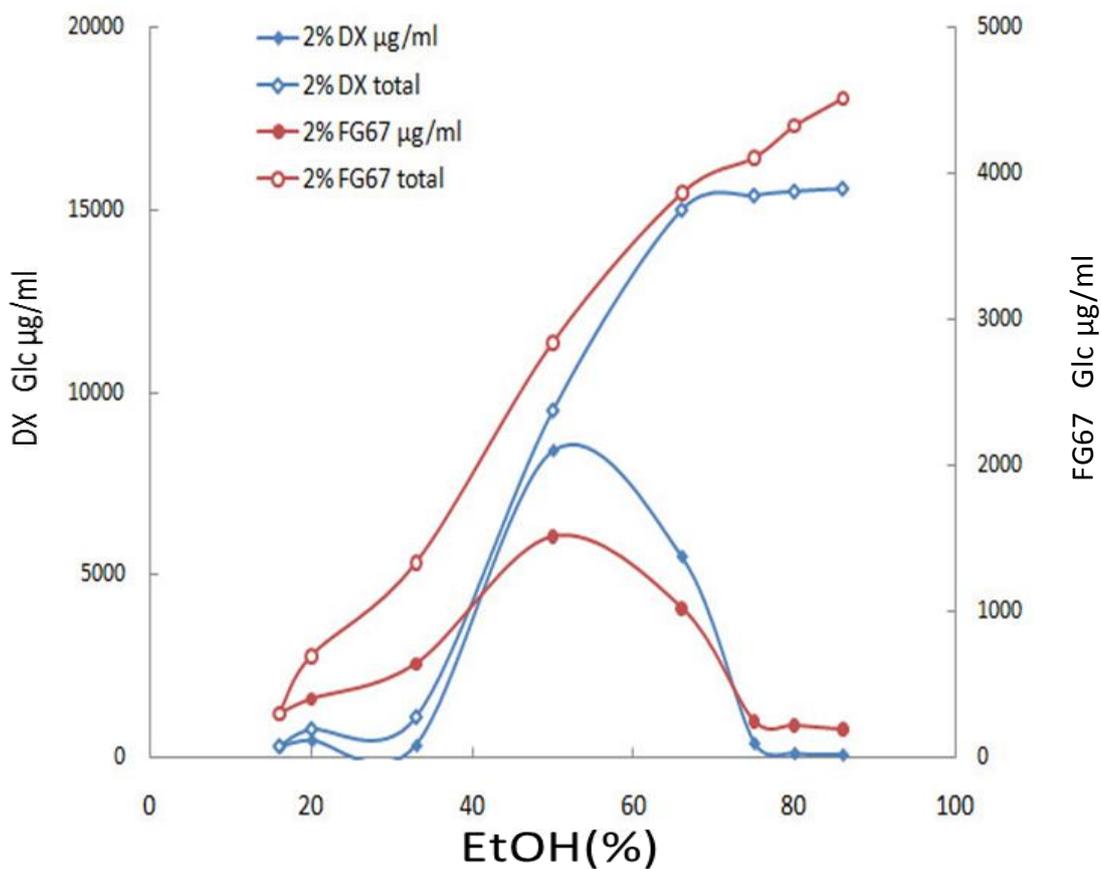


図 53. 基質 DX および FG67 のエタノール沈殿法による高分子多糖の回収

次に、限外ろ過膜を用いる方法について検討した。分子量の異なる4種類のDXの2%溶液を分子量3千、1万、3万の限外ろ過膜で処理し、内液と外液のそれぞれの全糖量を測定した結果、フィルターの種類、基質の分子量に関わらず内液が残り、基質オリゴ糖との分離が不十分であり、この方法は反応生成物の測定に適していないと結論された(図54)。

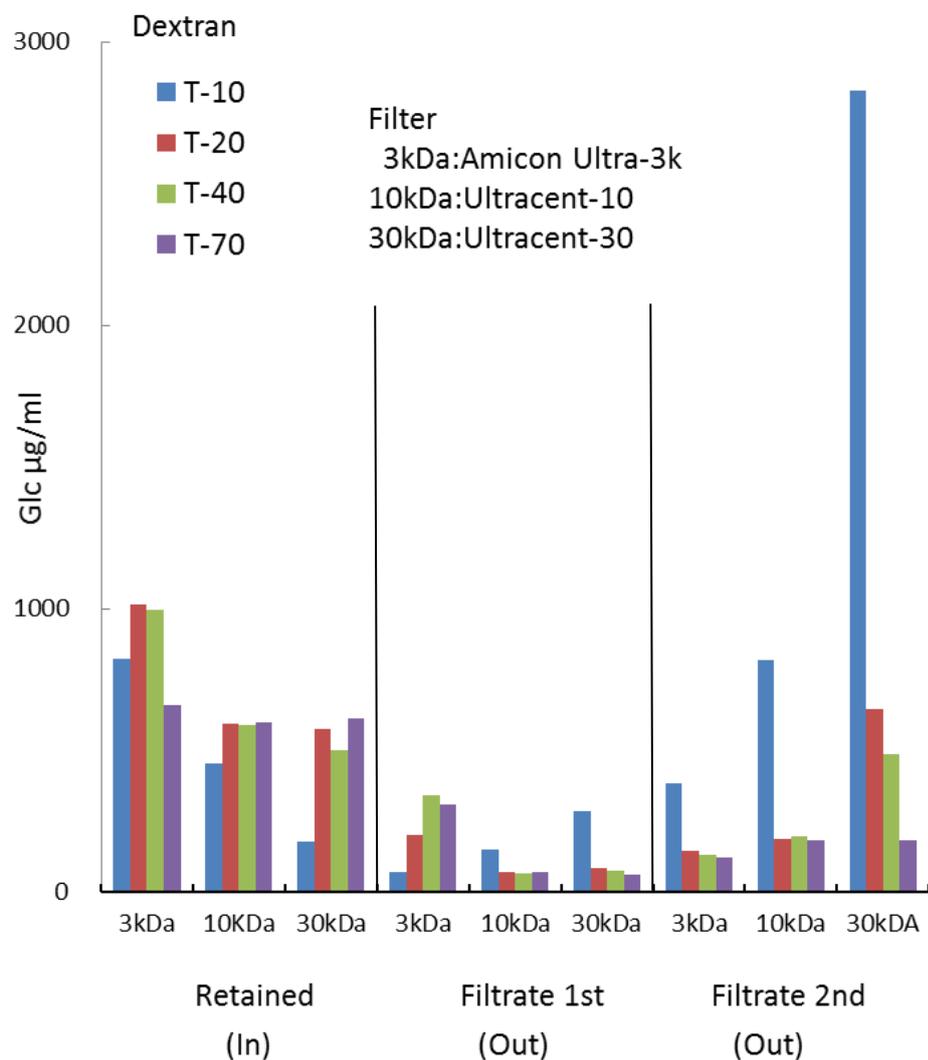


図54. 限外ろ過膜による高分子多糖の回収

ここで、エタノール沈殿法による酵素活性測定法の有用性を確かめるために酵素の最適作用 pH を測定した。酵素反応によって生成された高分子の反応生成物を通常の A500 測定と、エタノール沈殿法により高分子の反応生成物を回収した後に A490 で測定して比較した。その結果、どちらの場合も pH 6.5 付近で最大活性を示した。この結果は、先の酵素の性質の測定で得られた最適作用 pH(図 40)の結果と一致していた。

さらに、この方法による測定の結果から、本酵素は FG67 を基質としてその加水分解のみならず、転移作用に基づく高分子の反応生成物をも触媒していることが裏付けられた。

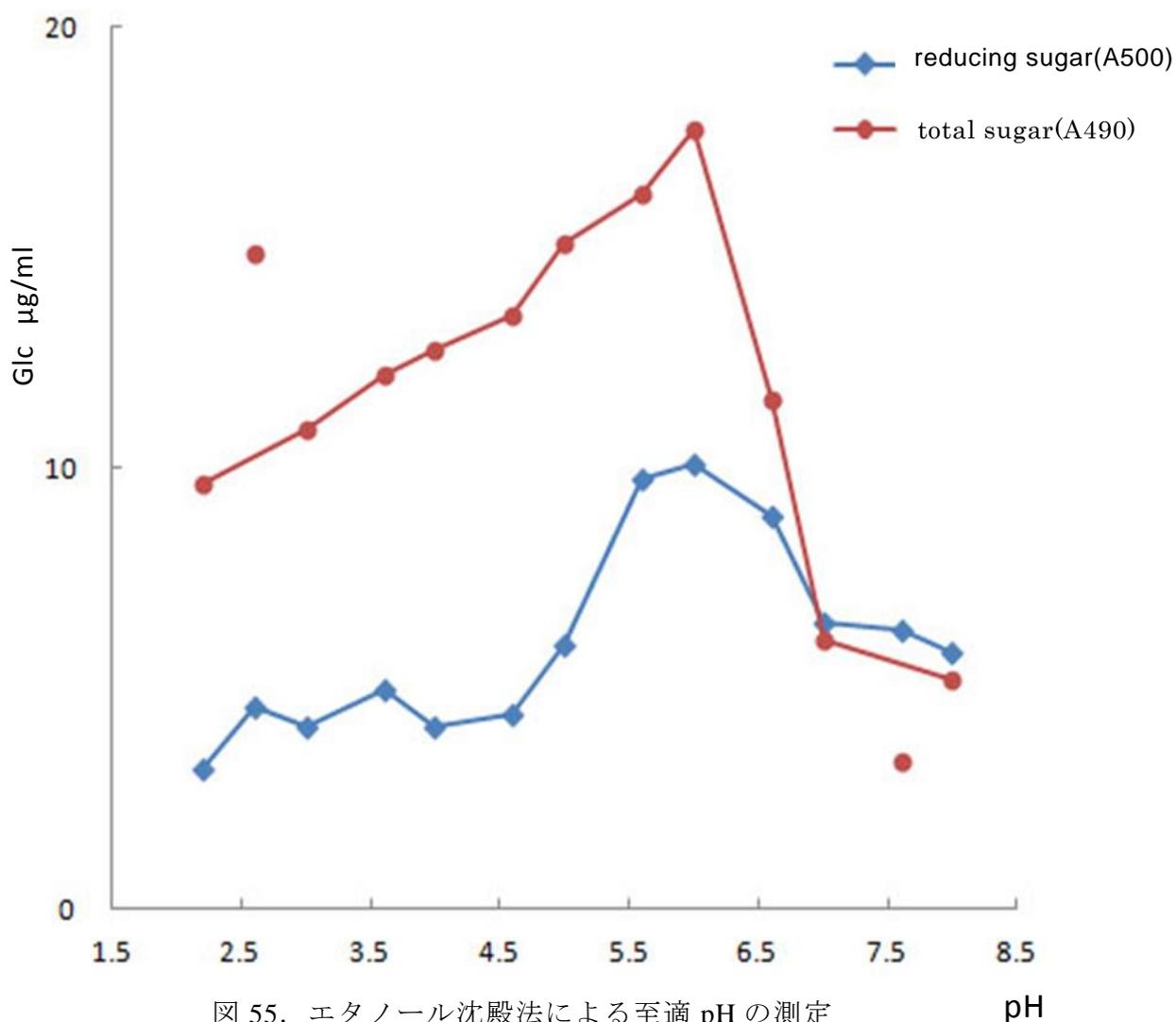
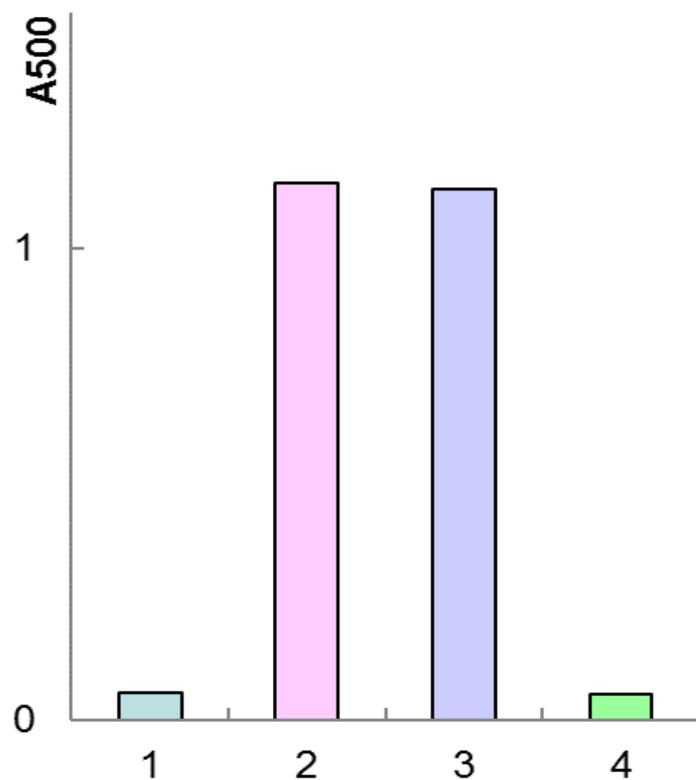


図 55. エタノール沈殿法による至適 pH の測定

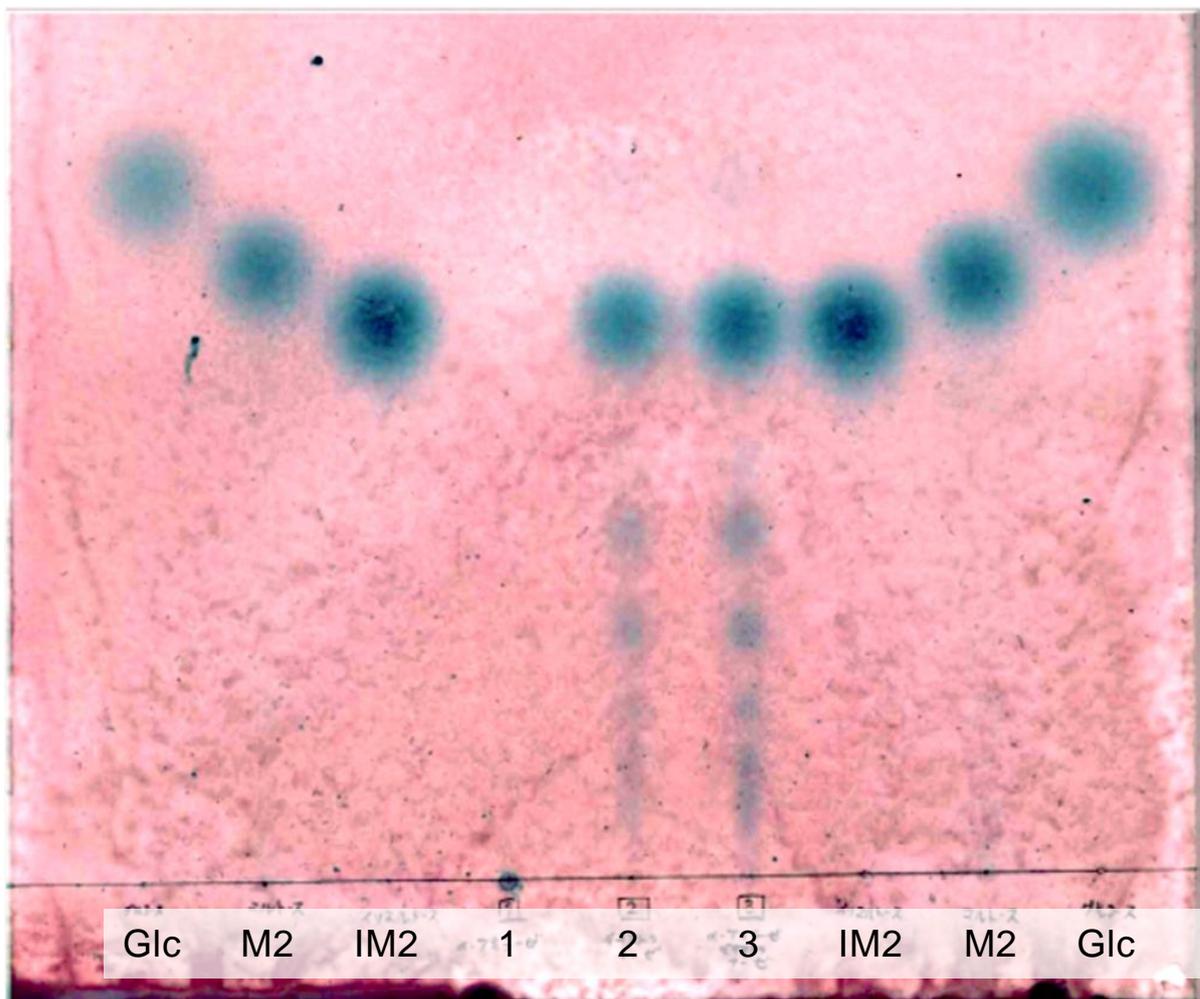
さらに反応生成物として Sephadex G-25 カラムより回収した peak1 に  $\alpha$ -アミラーゼとエンドデキストラナーゼを作用させた結果生じた還元糖量を、グラフに示した(図 56)。 $\alpha$ -アミラーゼでは反応生成物は分解されず、ほぼブランクの値と変わらなかったのに対してデキストラナーゼでは顕著に分解されることが示されたことから、反応生成物には  $\alpha$ -1,6 結合が含まれていることが示唆された。



- 1:  $\alpha$ -アミラーゼ (A)
- 2: デキストラナーゼ (B)
- 3: (A)+(B)
- 4: blank

図 56. 反応生成物の酵素分解

この反応生成物を酵素分解した試料を TLC 分析した。先の棒グラフで示したとおり  $\alpha$ -アミラーゼによる分解ではブランクと同様にスポットは原点のみにあり低分子の糖は検出されなかった。デキストラナーゼ分解では、イソマルトースの濃いスポットの他にイソマルトオリゴ糖と推定される複数のスポットが見えることから、デキストラナーゼによる分解産物中には重合度の高いイソマルトオリゴ糖が含まれていることが分かった(図 57)。



Sample 1:  $\alpha$ -アミラーゼ(A) 2: デキストラナーゼ(B) 3: (A)+(B)

図 57. 反応生成物の酵素分解物の TLC 分析

## (2) 酵素分解物の解析

次に、反応生成物の酵素分解物を HPLC 分析した。まず、先の Sephadex G-25 カラムで分画した反応生成物の peak1~3 を分析した結果、peak2 と peak3 でオリゴ糖のピークが検出された(図 58)。その後、反応生成物の peak1 を酵素分解した試料を HPLC 分析した。A500 および TLC の結果と同様に Sephadex G-25 peak1 は、 $\alpha$ -アミラーゼではほとんど分解されていなかった。デキストラナーゼ分解では、イソマルトオリゴ糖の peak が検出されたことから、Sephadex G-25 の peak1 には  $\alpha$ -1,6 結合を含むデキストラン類似の構造があることが示唆された。また、両酵素を同時に作用させた場合には、デキストラナーゼ単独で作用させた場合よりもオリゴ糖が多く生成することから、 $\alpha$ -1,4 結合が何らかの形で関わっている可能性があるように考えられる(図 59)。

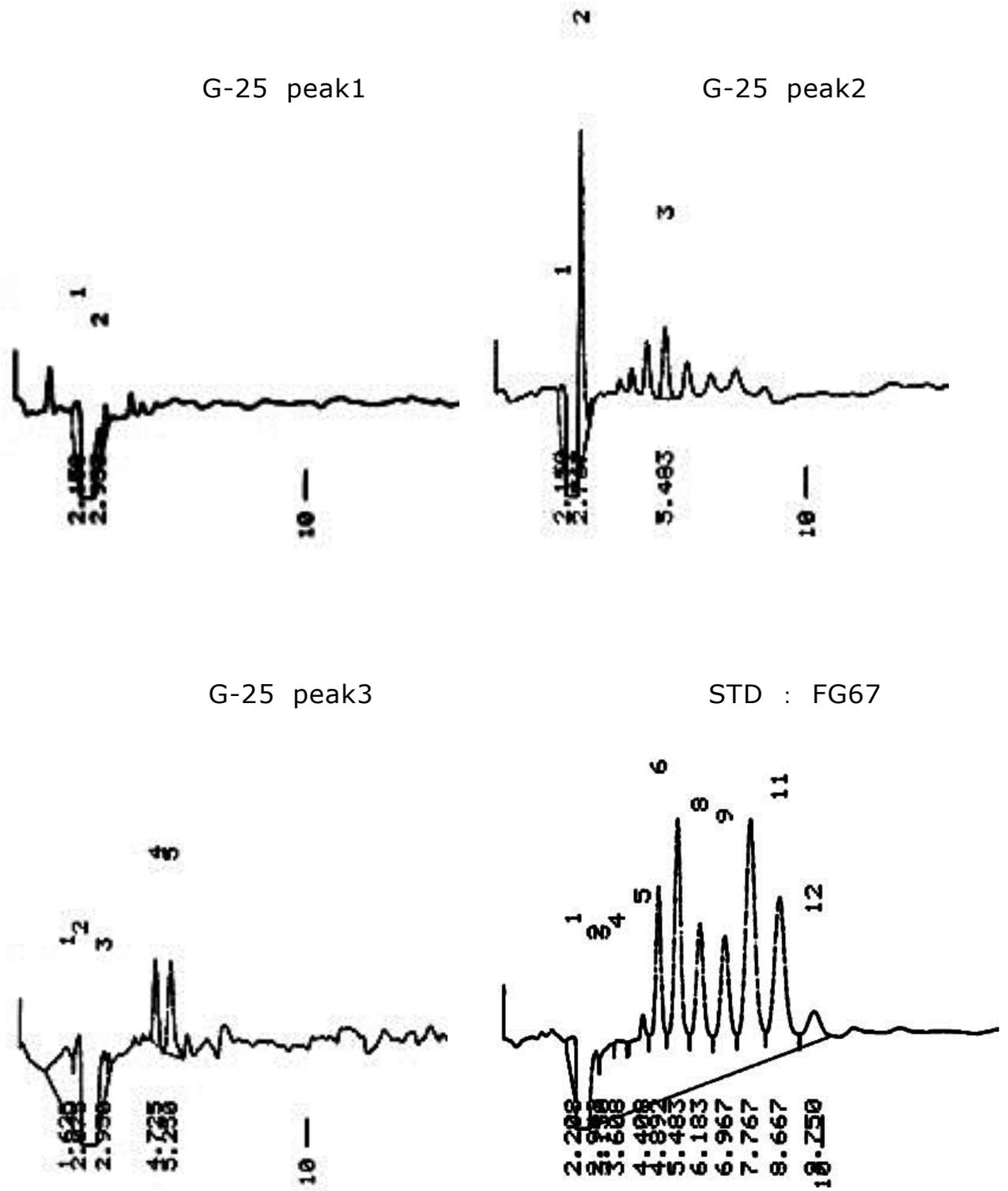


図 58. 反応生成物の HPLC 分析(Sephadex G-25 カラム分画の p1~p3)



次に、各種基質による反応生成物(Product #4; SST, DX, FG67p)を基質として粗酵素と反応させて得られた高分子画分)をグルコデキストラナーゼで分解した。この酵素は、北海道大学の木村淳夫教授からいただいたものを使用した。STDと、反応生成物に作用させた結果を比較してみると、グルコデキストラナーゼはDXに作用して、チャートに示したようにGlcのみを生成する。HPLCのチャートを見ると、反応生成物は基質の種類に関わらずよく分解され、どれも似たような形のピークが得られた(図 60)。3種類の基質で合成した反応生成物はSSTから生成したRtのマルトオリゴ糖のピークと一致した。このことから、本酵素による反応生成物は、基質の種類に関わらずよく似た性質のものを生成していると考えられる。

続いて、反応生成物をプルラナーゼ、イソアミラーゼで分解した。基質SSTからの反応生成物はプルラナーゼでよく分解され、マルトオリゴ糖のピークが多数検出された。イソアミラーゼで分解した結果は、STDのSSTの分解物のピークと一致した(図 61)。また基質DXのイソアミラーゼ分解では、STDのDXでは分解を受けていないのに対して、反応生成物は分解され、イソマルトオリゴ糖に相当する多数のピークを検出した(図 62)。以上の結果から本酵素が各種の基質に作用してできた反応生成物は、 $\alpha$ -1,6と $\alpha$ -1,4結合が共存するような構造を持つ可能性が示唆された。

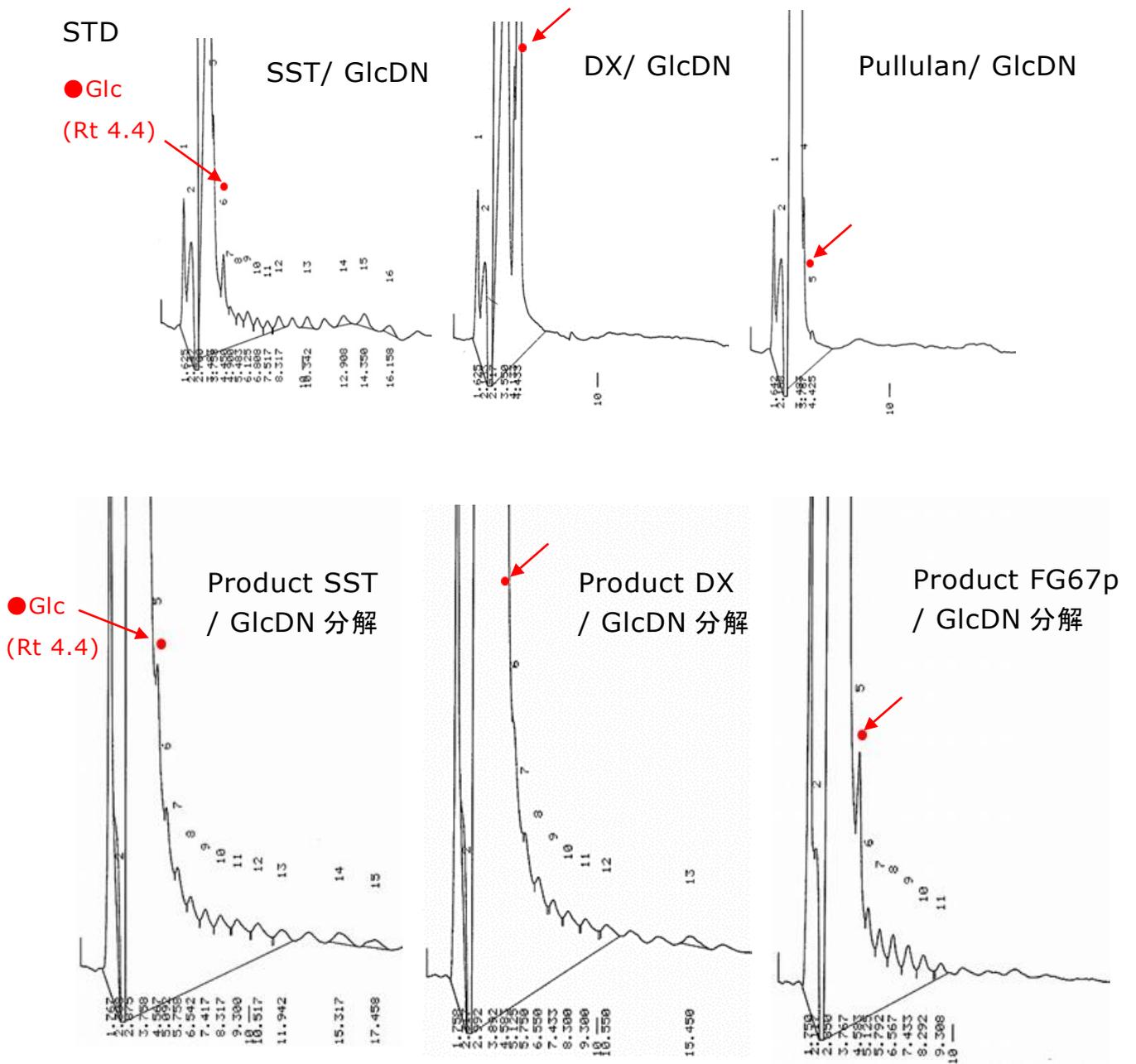


図 60. 反応生成物のグルコデキストラナーゼによる酵素分解

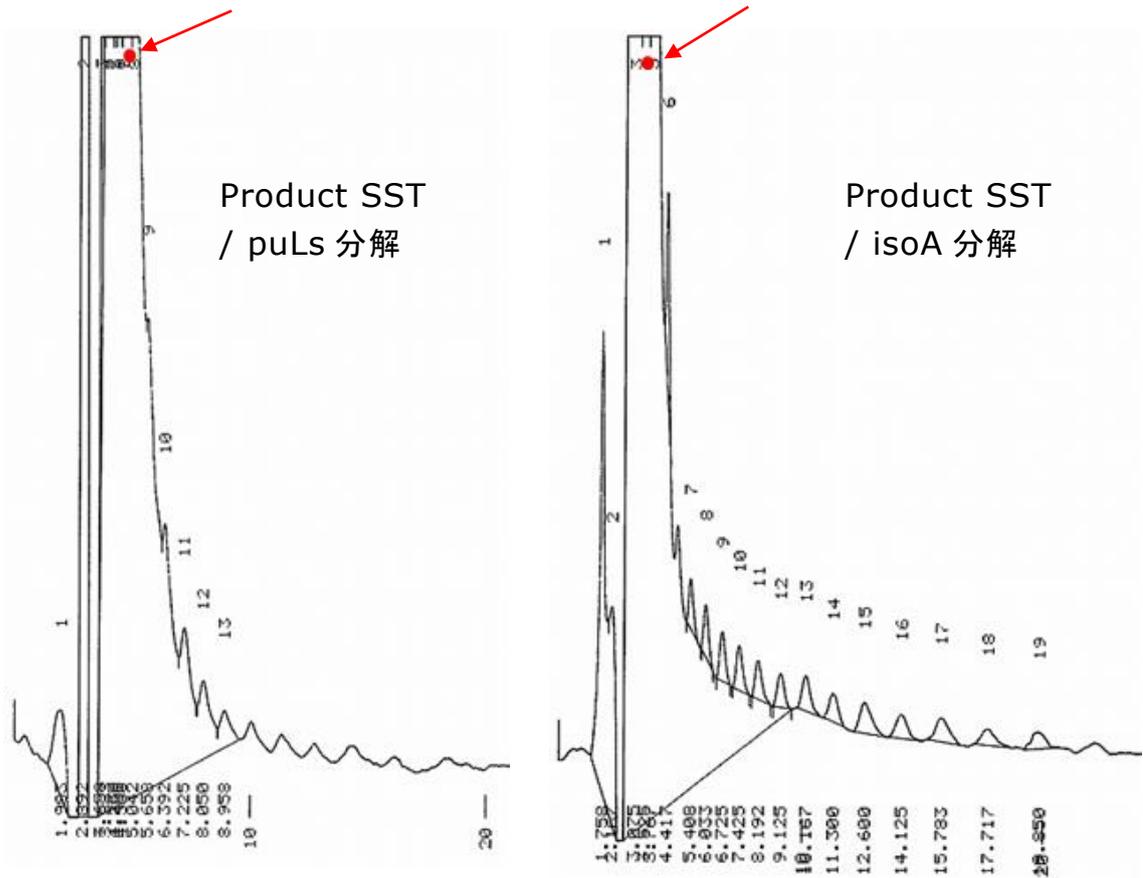
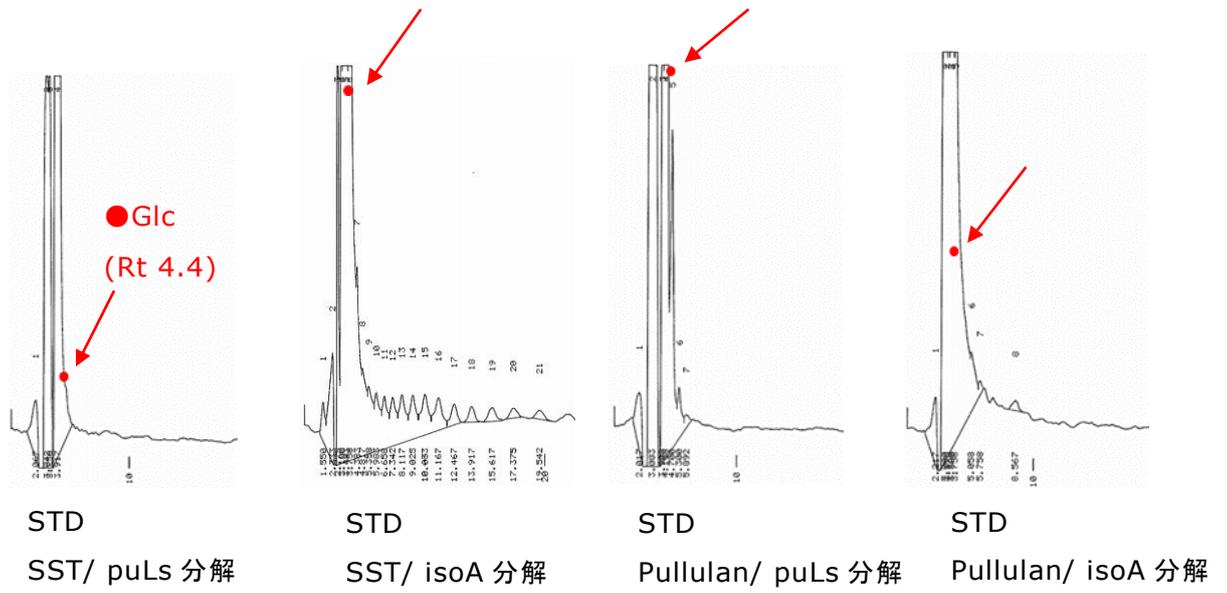


図 61. 反応生成物 (反応基質 SST)のプルラナーゼ・イソアミラーゼ)による酵素分解

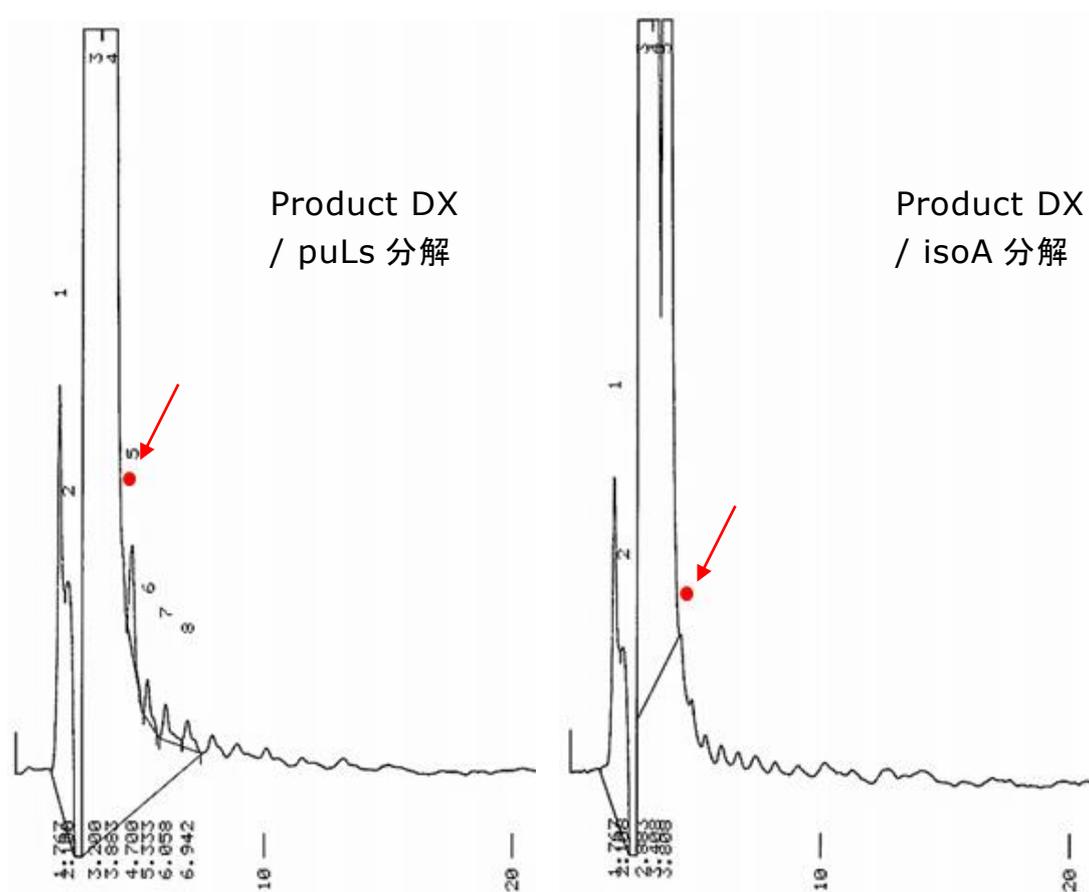
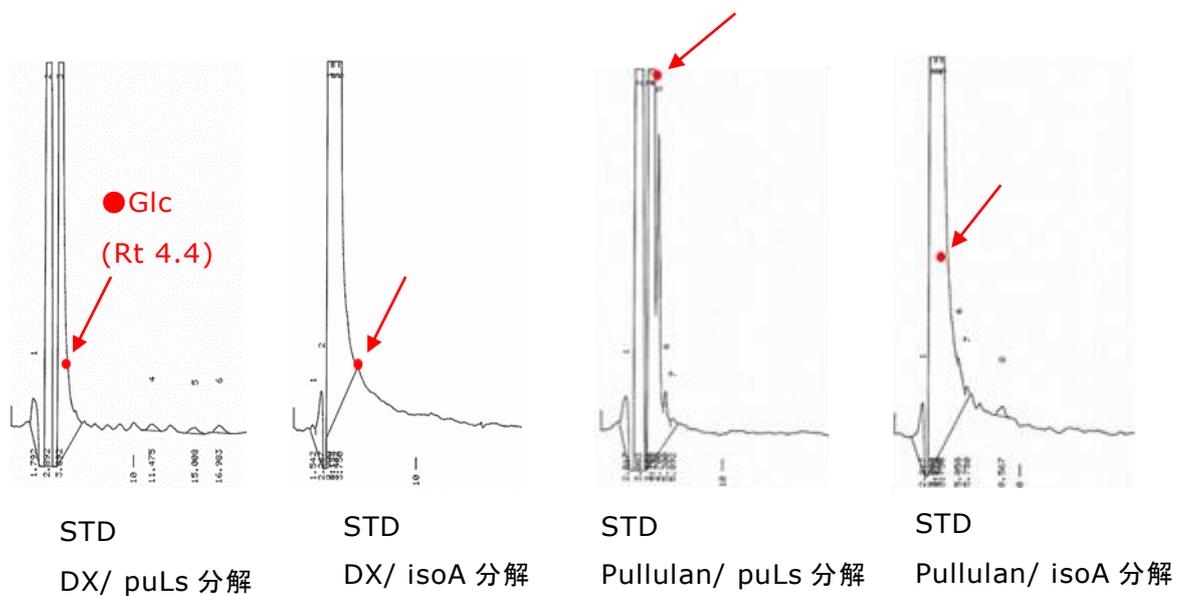


図 62. 反応生成物 (反応基質 DX)のプルラーゼ・イソアミラーゼ) による  
酵素分解

これまでの#4の反応生成物を酵素分解したものの分解率を算出し、表にまとめた(表5)。反応生成物は原糖として用いた基質の種類に関わらず分解を受け、分解率は1~7%程度であった。活性は低かったものの、 $\alpha$ -1,4結合型の基質から生成された反応生成物はデキストラナーゼで分解を受け、また $\alpha$ -1,6結合型の基質から生成された反応生成物も $\alpha$ -アミラーゼやイソアミラーゼで分解を受けた。このことから、反応生成物は $\alpha$ -1,4結合と $\alpha$ -1,6結合型が混在している形であることが示唆された。

表5. #4の反応生成物の各酵素による分解率(%)

Enzyme	Product(SST)	Product(DX)	Product(FG67p)
$\alpha$ -アミラーゼ	3	3	3
デキストラナーゼ	1	7	3
プルラナーゼ	3	3	4
イソアミラーゼ	2	2	2
グルコデキストラナーゼ	1	3	2

次に、各種基質による反応生成物(Product #4; SST, DX, FG67p)を基質として粗酵素と反応させて得られた高分子画分)を精製したグルコアミラーゼで分解し、経時的に分解率を算出した。STDとして、2%の各基質を同様に経時的に反応させた結果を挿入した(図 63)。STDのSSTとプルランの分解は立ち上がりに差があるものの、どちらも24h反応で40%以上の分解が得られたが、基質DXでは、ほぼ直線的に分解が継続し、72hで15%の分解率となった。一方、これら3種の基質から $\alpha$ -グルカナーゼ反応により生成された高分子の反応生成物は、どれも同じように分解が進行して24h反応で分解率25%前後になった。以上の結果から、反応生成物はSSTとDXの中間的なプルランに似た構造を持っている可能性が示唆された。

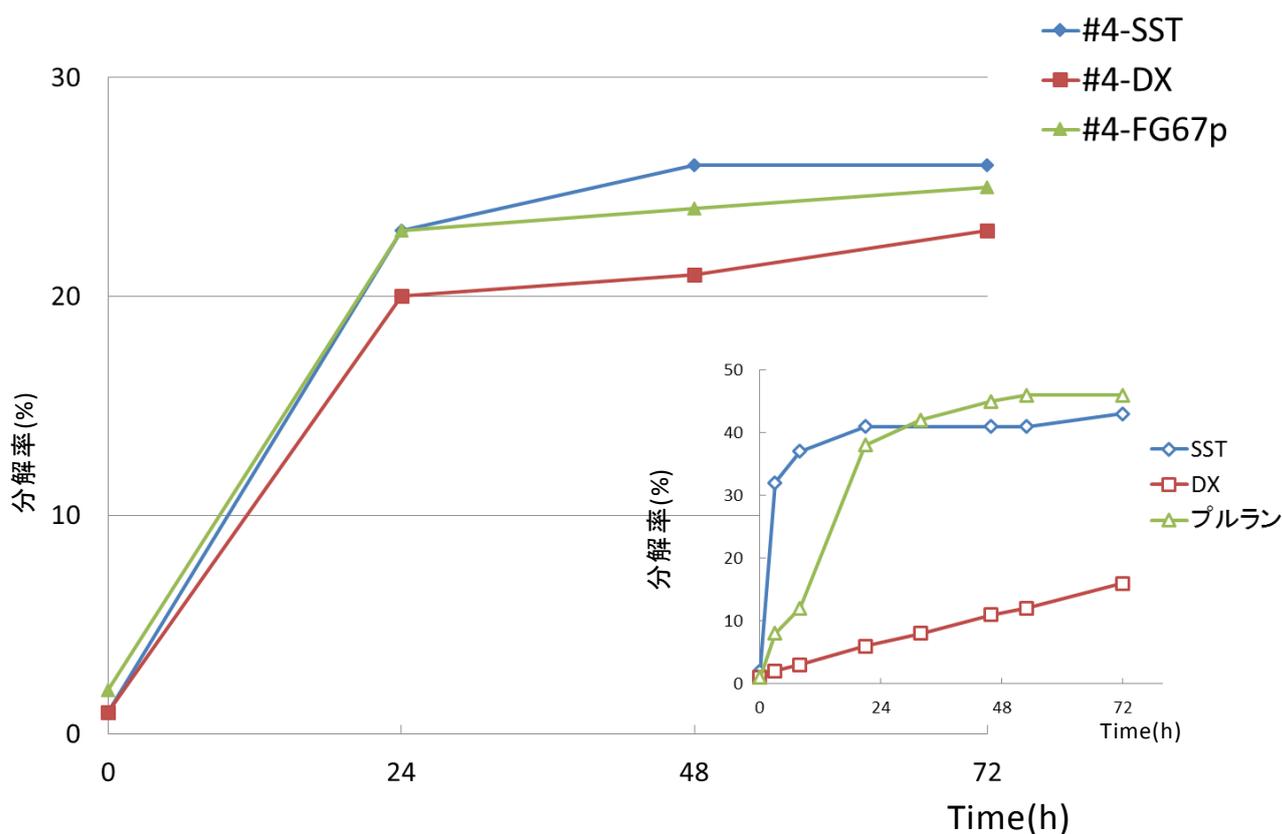


図 63. 反応生成物の酵素分解 経時変化(グルコアミラーゼ)

### (3) NMR 分析

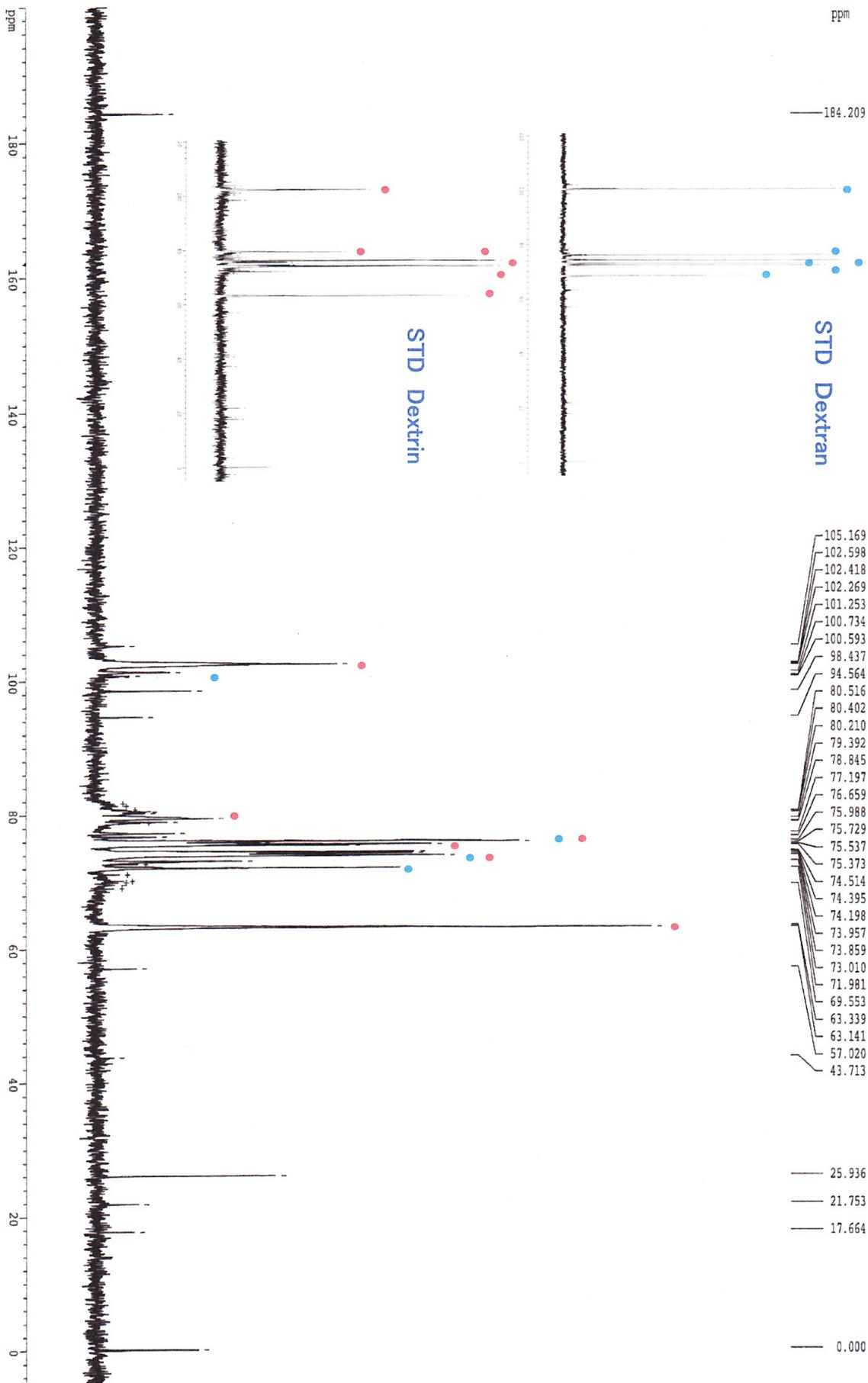
次に、反応生成物を NMR 分析した。今回、NMR に供した試料は標準糖として SDX(20 mg/ 0.6 mg), DX(20 mg/ 0.6 mg), FG67(12.9 mg/ 0.6 mg), および酵素とフジオリゴ FG67 の反応生成物を調製し、95 %エタノール沈殿を 2 回繰り返して回収した多糖画分を反応生成物#3(25 mg/ 0.6 mg), #4(29 mg/ 0.6 mg), #5 (57 mg/ 0.6 mg) としたものである。

$^{13}\text{C}$  NMR にて、STD として  $\alpha$ -1,4 結合型の SDX と  $\alpha$ -1,6 結合型の DX を用いて反応生成物と比較した。図中の青○丸は DX, 赤○丸は SDX に見られる主要なピークのケミカルシフトの位置に対応する。その結果、反応生成物のチャートには基質由来の  $\alpha$ -1,4 結合のほか、デキストランタイプの  $\alpha$ -1,6 結合も含まれていることが分かった(図 64)。

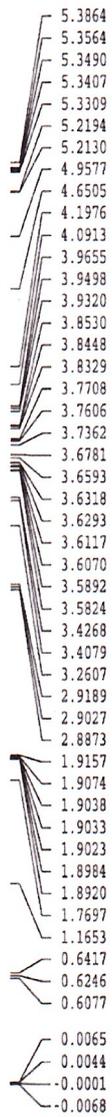
また、 $^1\text{H}$  NMR の結果では、STD のケミカルシフト 5.4 の位置に  $\alpha$ -1,4 結合、ケミカルシフト 4.95 の位置に  $\alpha$ -1,6 結合を示す高いシグナルがそれぞれに現れた。反応生成物のチャートを STD と比較してみると、 $\alpha$ -1,4 結合、 $\alpha$ -1,6 結合ともに対応する場所にシグナルが出た。また、2 次元 NMR の結果からこの酵素は  $\alpha$ -1,4 結合している基質に作用して、 $\alpha$ -1,6 結合の分岐が生成していることが分かった。しかしながら、 $\alpha$ -1,6 結合の直鎖状構造に相当するスペクトルは確認されなかったため、本酵素は転移反応によって短鎖の  $\alpha$ -1,4,  $\alpha$ -1,6 結合を生成することが推察された(図 65)。二次元 NMR のチャートから、FG67 由来の反応生成物に  $\alpha$ -1,6 結合のピークがあるものの、シグナルとして検出されていないため、 $\alpha$ -1,6 結合の直鎖は 4 個未満であることが分かった。つまり、オリゴ糖分子に  $\alpha$ -1,6 結合の枝がついており、これは直鎖状に伸びてはいない。また、この分岐は還元末端に由来しない、直鎖の途中に結合している可能性が高いといえる。

ピークエリアから、 $\alpha$ -1,4 結合と  $\alpha$ -1,6 結合の強度比を算出したところ、5.7 : 1 となった。反応生成物の分子量は大きく、原料の  $\alpha$ -1,4 結合のオリゴ糖分子がオリゴ糖のまま  $\alpha$ -1,6 結合しており、基質として用いた FG67 よりも高分子になり、糖の数でいうと重合度 15~16 程度のものが生成されていると推察された。以降に標準糖(STD)等の NMR 分析の結果の素データを掲載した。

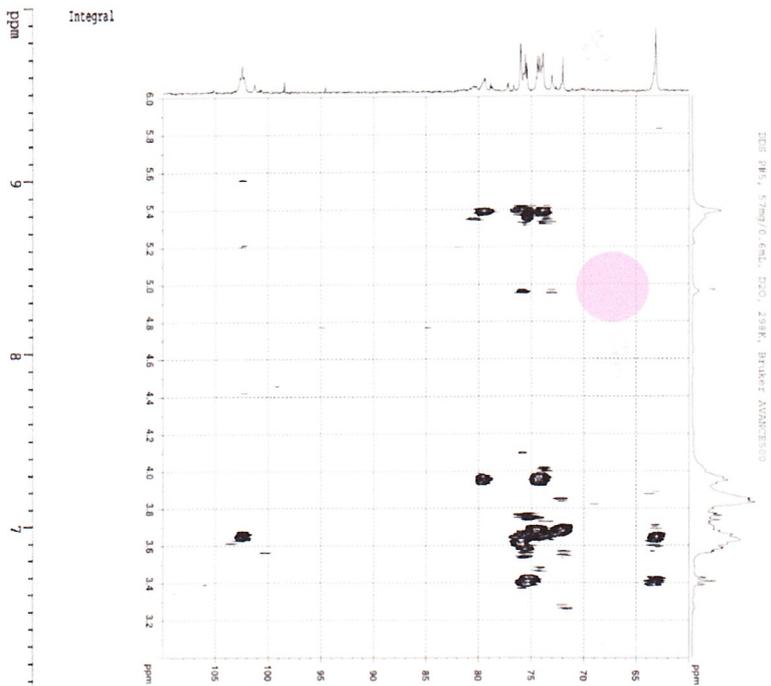
DDS P#5, 57mg/0.6mg, D2O, 298K, Bruker AVANCE500



DDS P#5, 57mg/0.6mg, D2O, 298K, Bruker AVANCE500

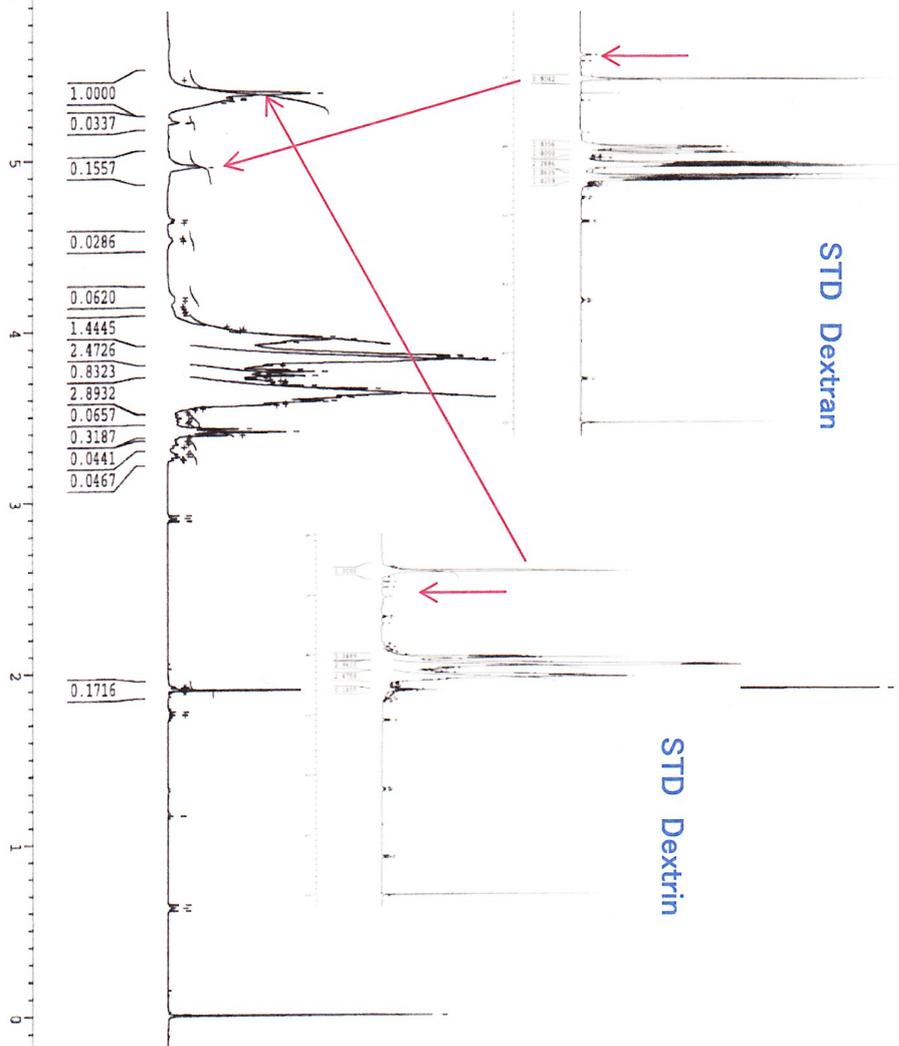


2dimension HMBC

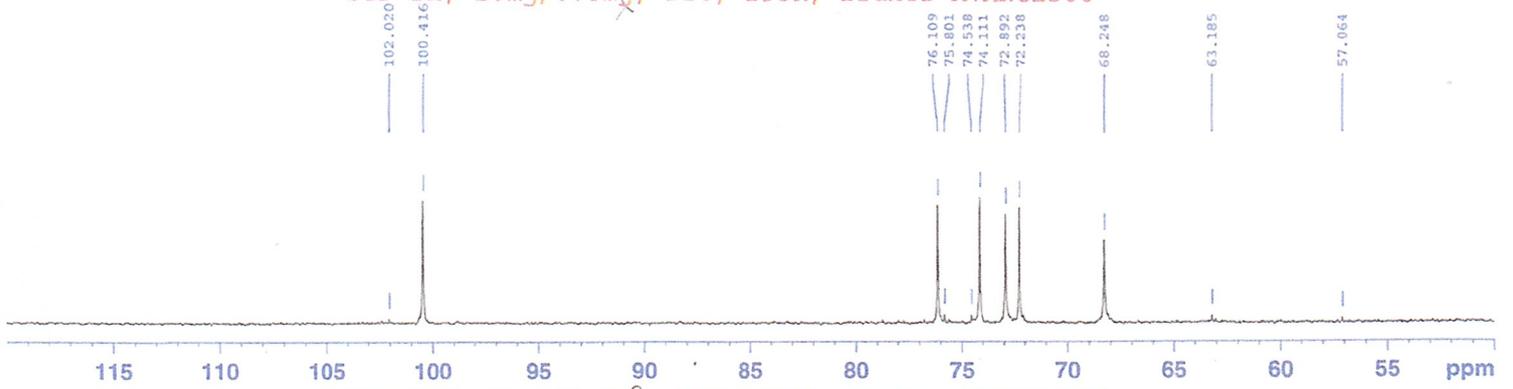


STD Dextran

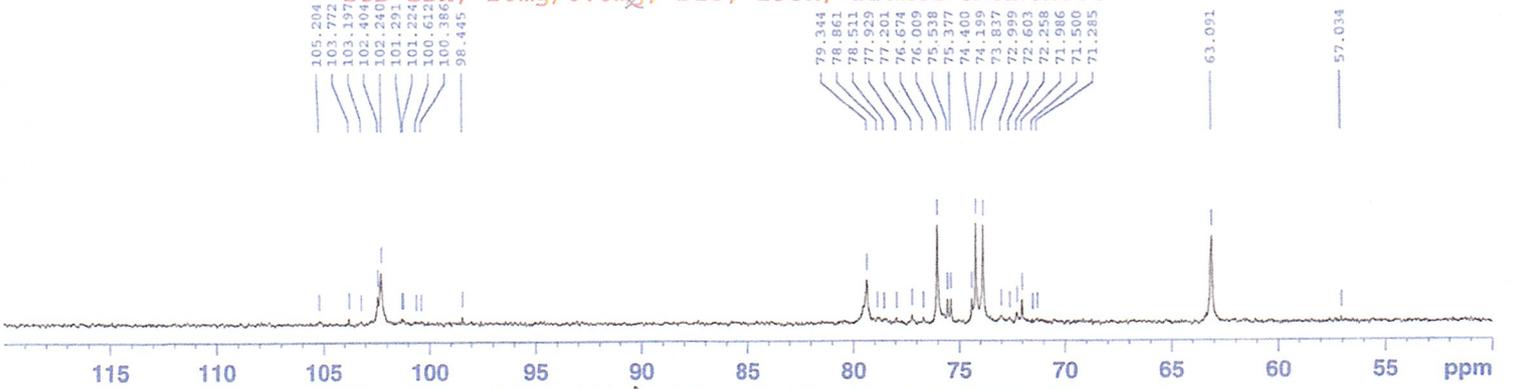
STD Dextrin



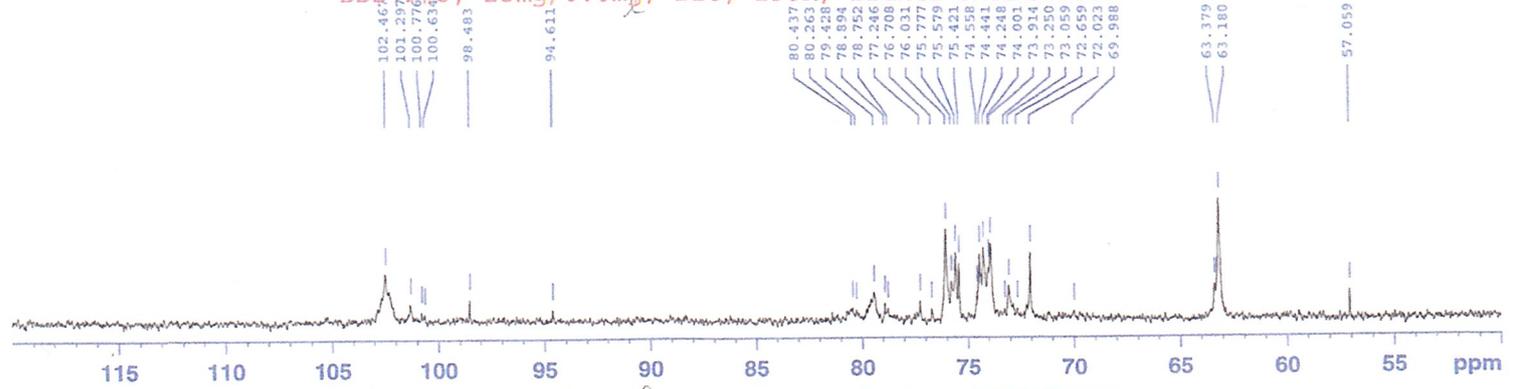
STD DX, 20mg/0.6mg, D2O, 298K, Bruker AVANCE500



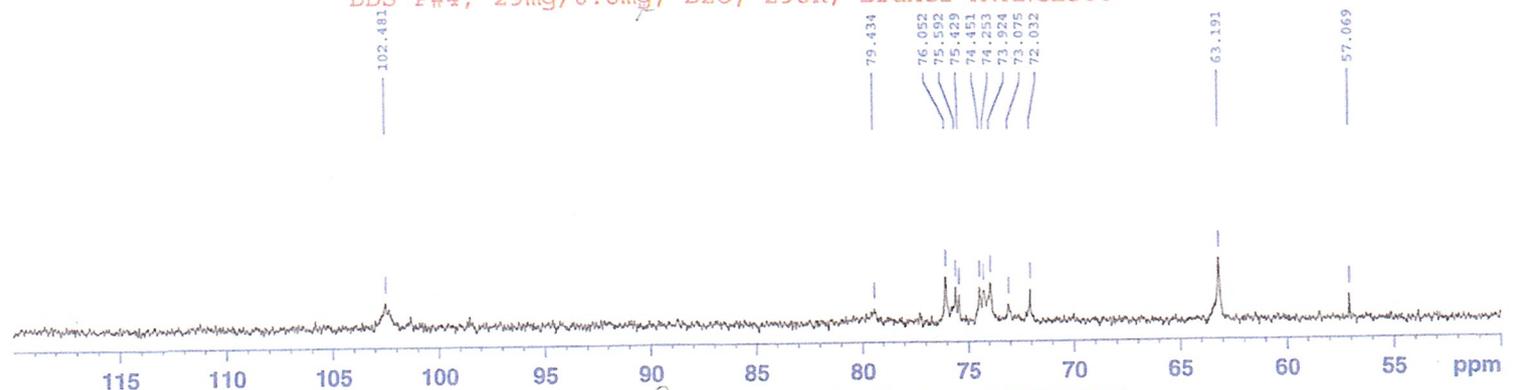
STD SDX, 20mg/0.6mg, D2O, 298K, Bruker AVANCE500



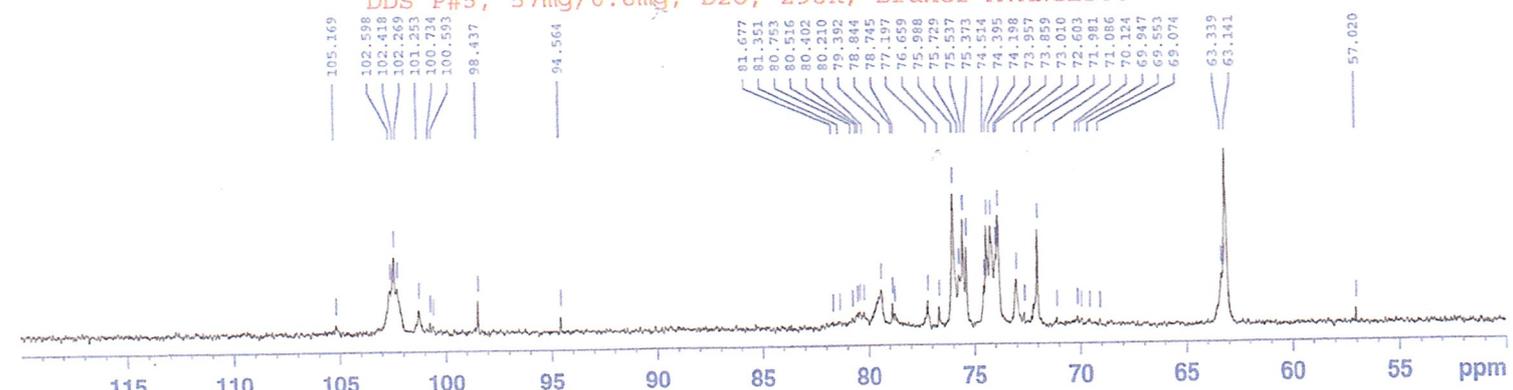
DDS P#3, 25mg/0.6mg, D2O, 298K, Bruker AVANCE500



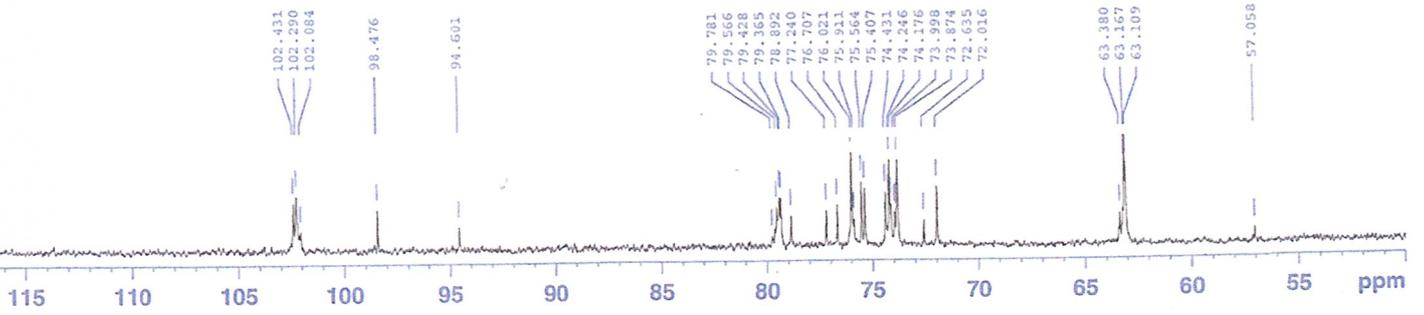
DDS P#4, 29mg/0.6mg, D2O, 298K, Bruker AVANCE500



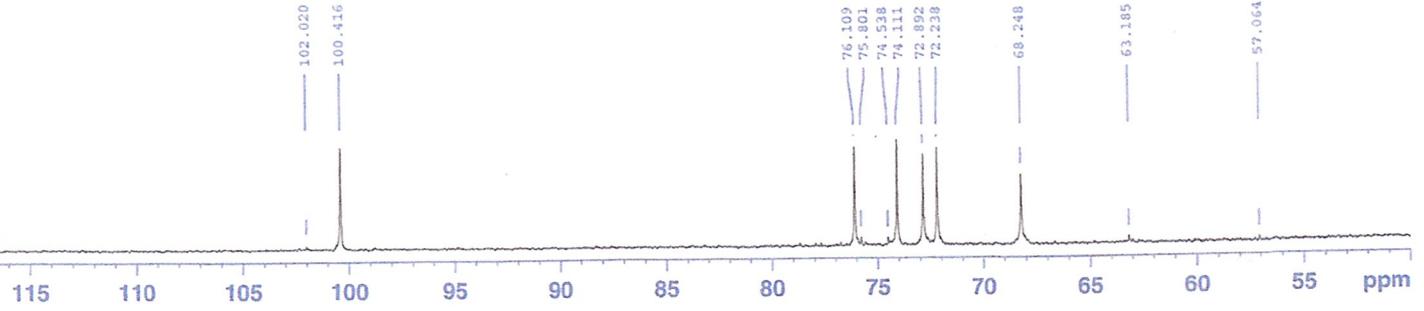
DDS P#5, 57mg/0.6mg, D2O, 298K, Bruker AVANCE500



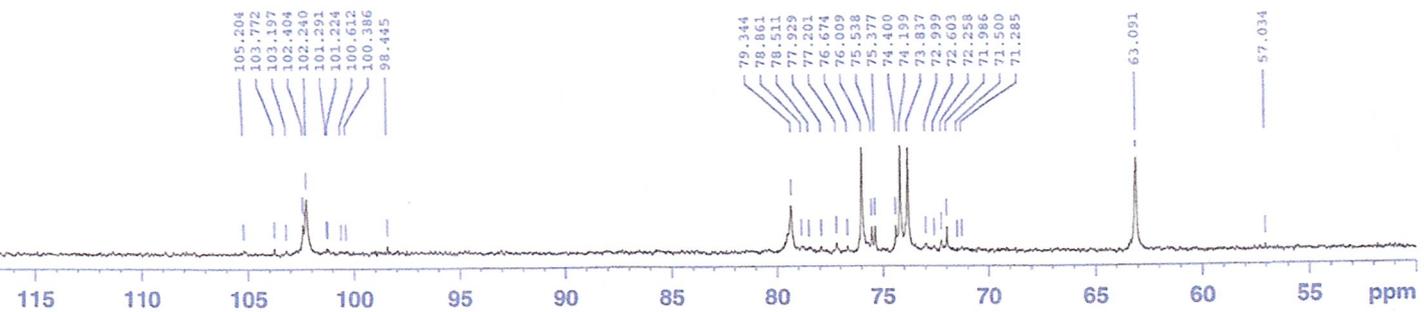
Fuji-Oligo G67, 12.9mg/0.6mL, D2O, 298K, Bruker AVANCE500



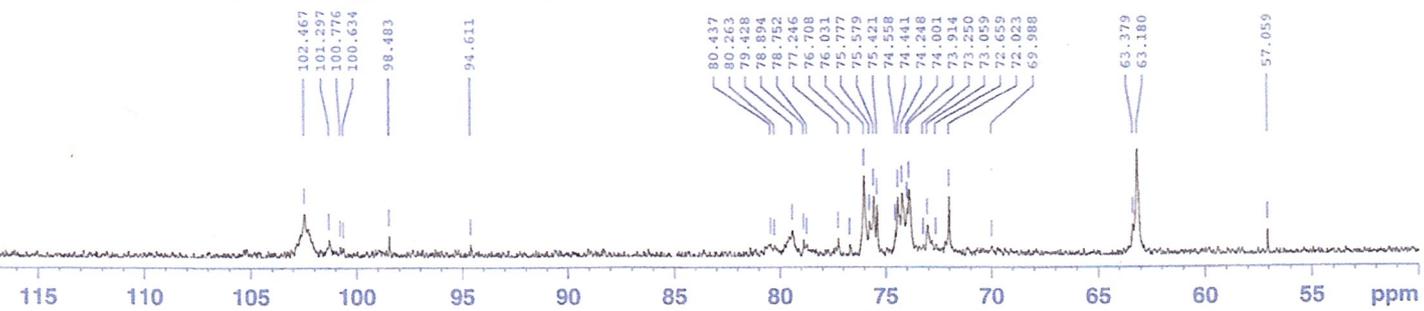
STD DX, 20mg/0.6mL, D2O, 298K, Bruker AVANCE500



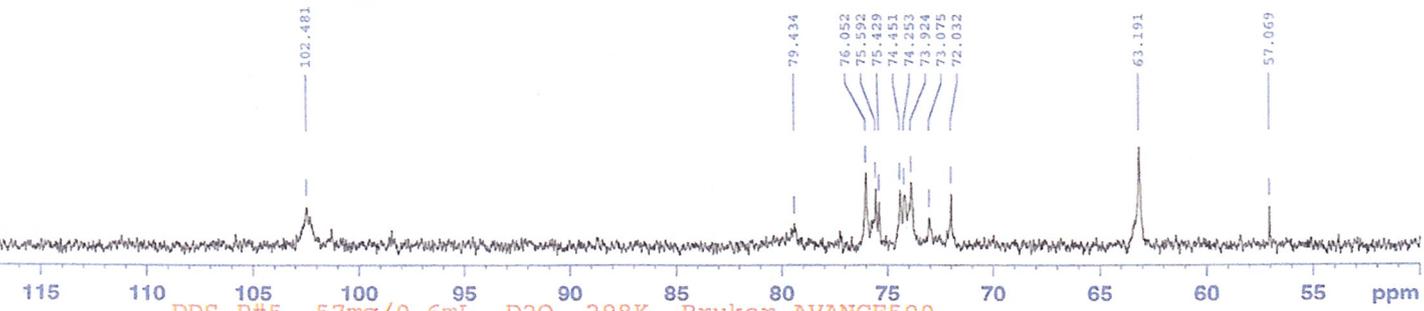
STD SDX, 20mg/0.6mL, D2O, 298K, Bruker AVANCE500



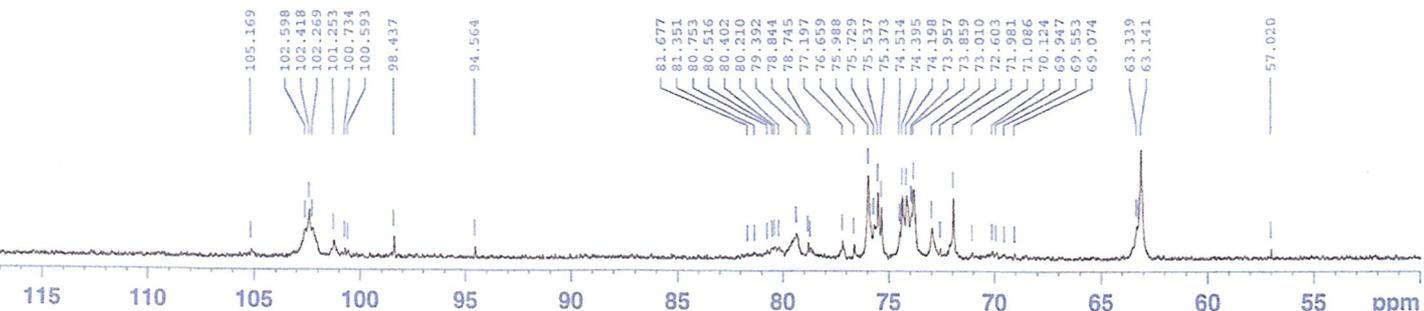
DDS P#3, 25mg/0.6mL, D2O, 298K, Bruker AVANCE500



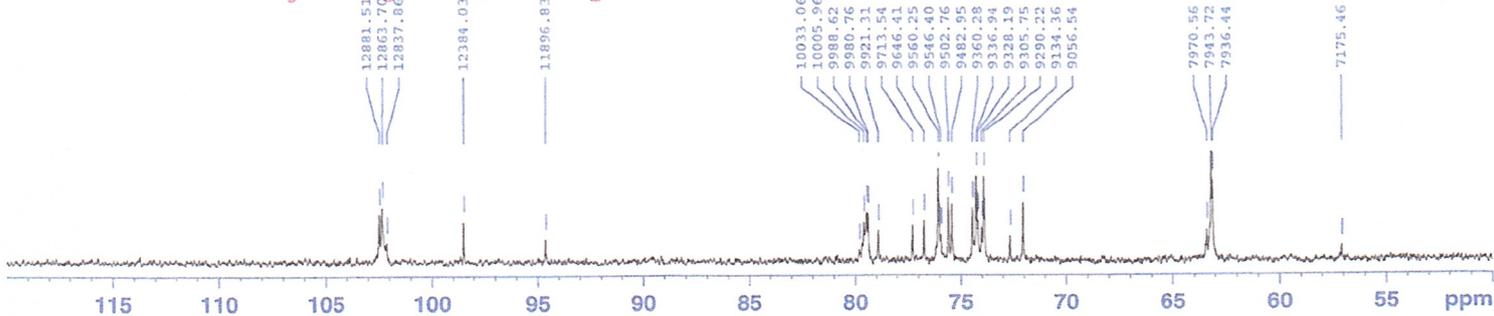
DDS P#4, 29mg/0.6mL, D2O, 298K, Bruker AVANCE500



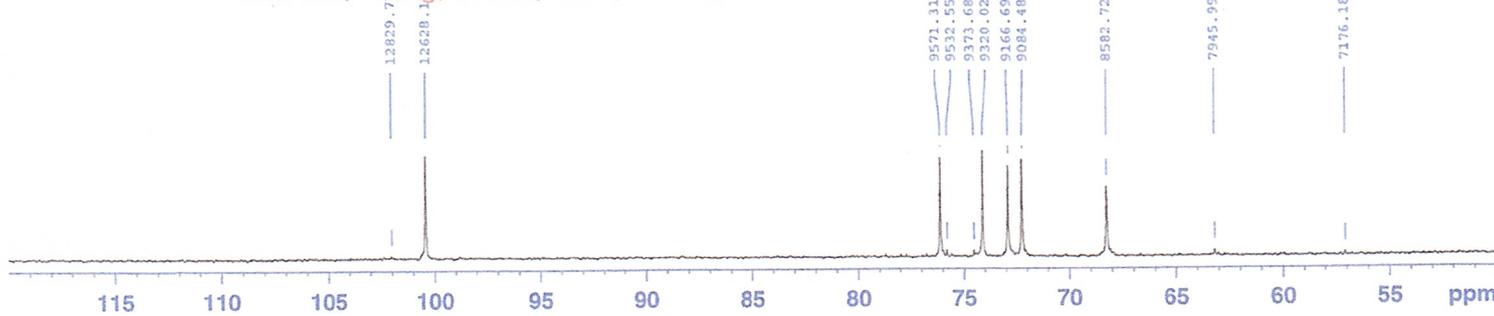
DDS P#5, 57mg/0.6mL, D2O, 298K, Bruker AVANCE500



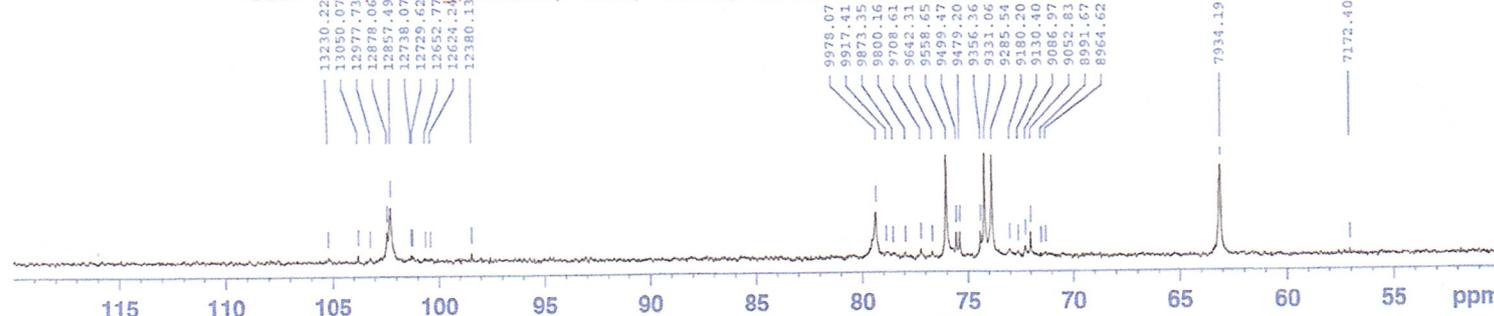
Fuji-Oligo G67, 12.9mg/0.6mL, D2O, 298K, Bruker AVANCE500



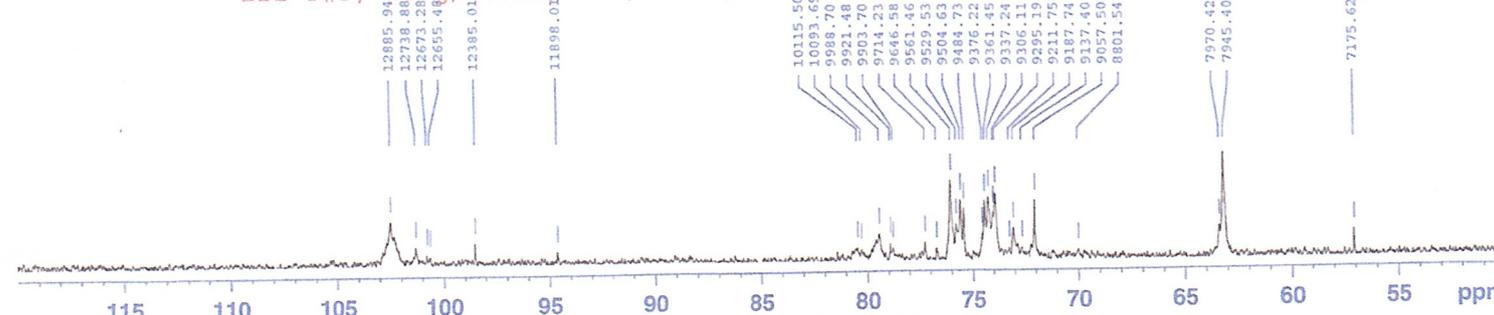
STD DX, 20mg/0.6mL, D2O, 298K, Bruker AVANCE500



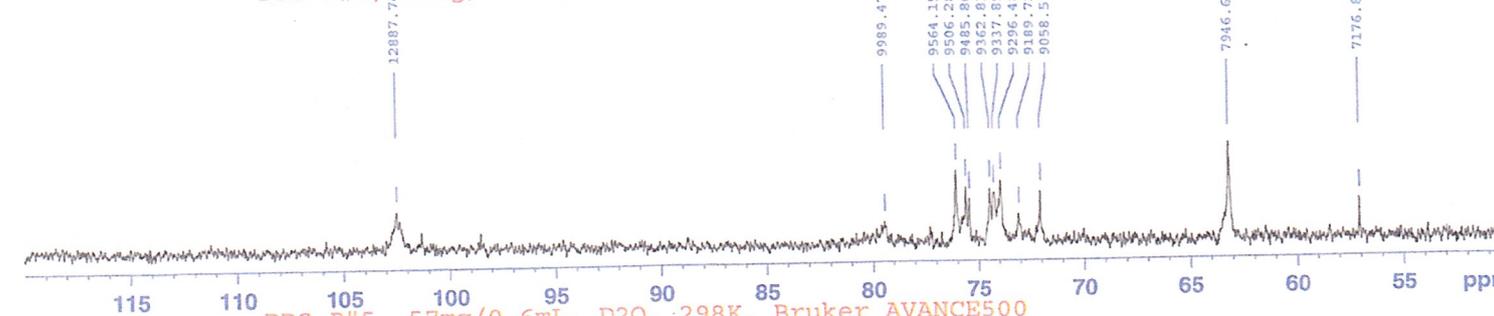
STD SDX, 20mg/0.6mL, D2O, 298K, Bruker AVANCE500



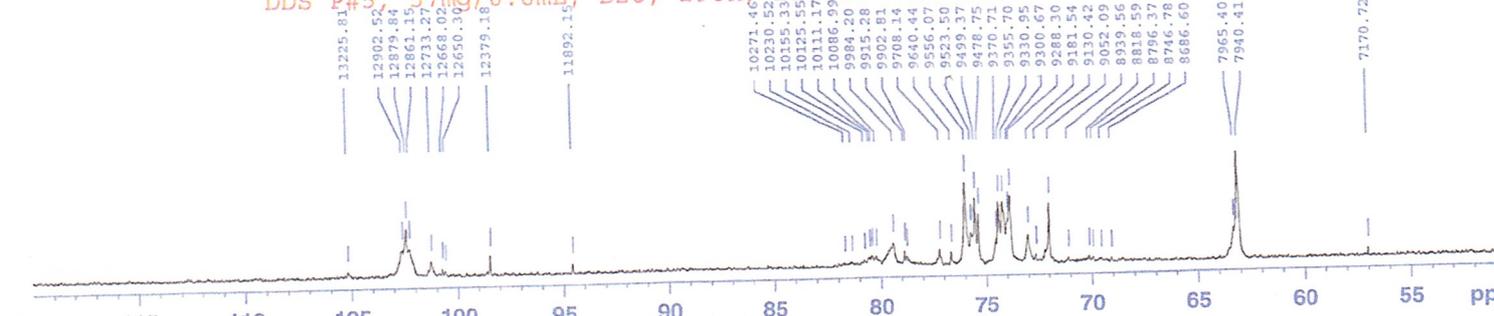
DDS P#3, 25mg/0.6mL, D2O, 298K, Bruker AVANCE500



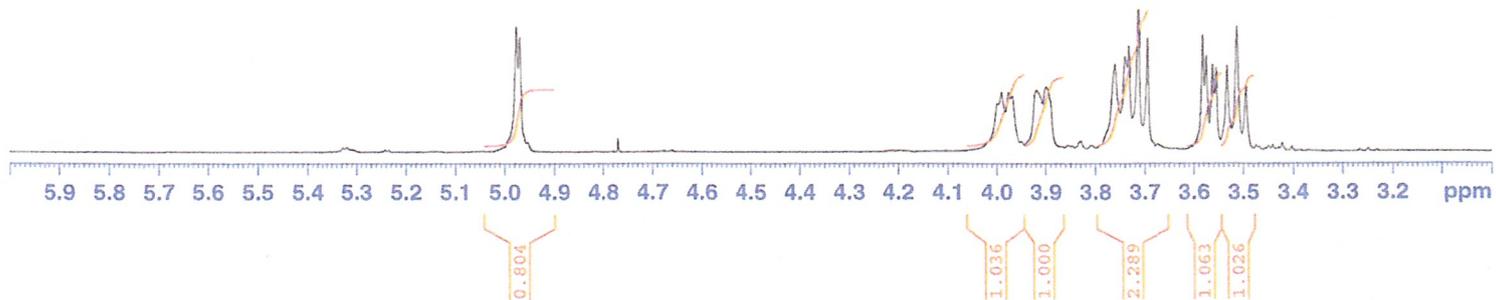
DDS P#4, 29mg/0.6mL, D2O, 298K, Bruker AVANCE500



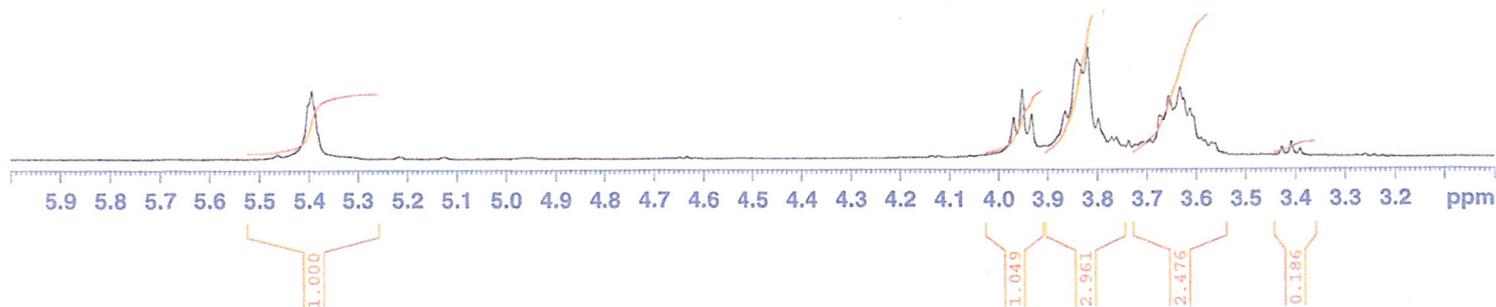
DDS P#5, 57mg/0.6mL, D2O, 298K, Bruker AVANCE500



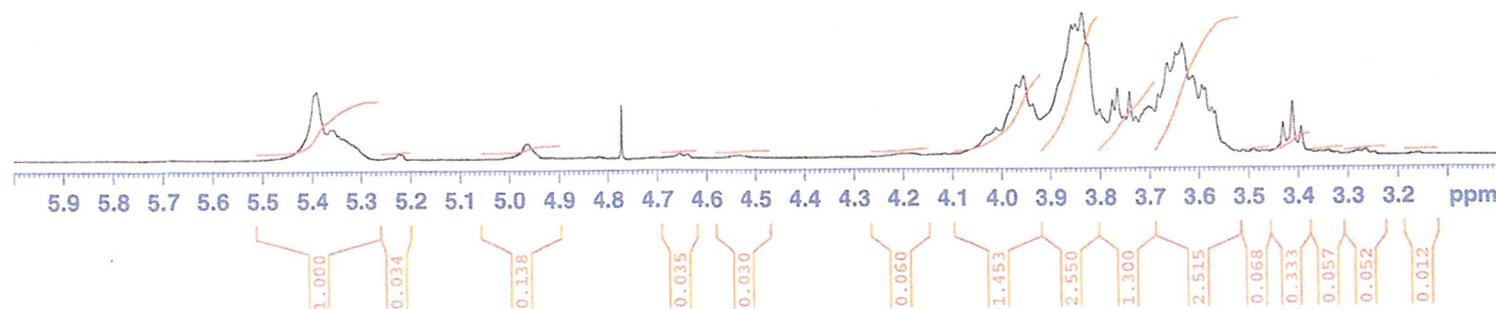
STD DX, 20mg/0.6mg, D2O, 298K, Bruker AVANCE500



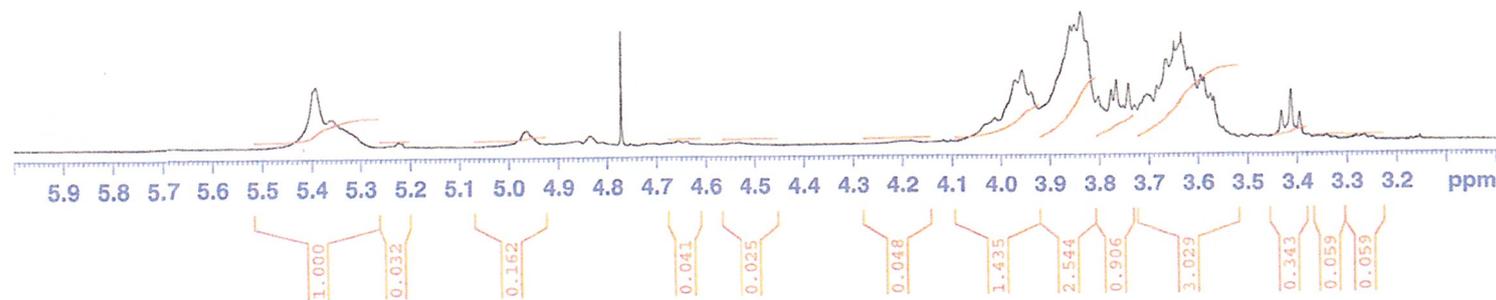
STD SDX, 20mg/0.6mg, D2O, 298K, Bruker AVANCE500



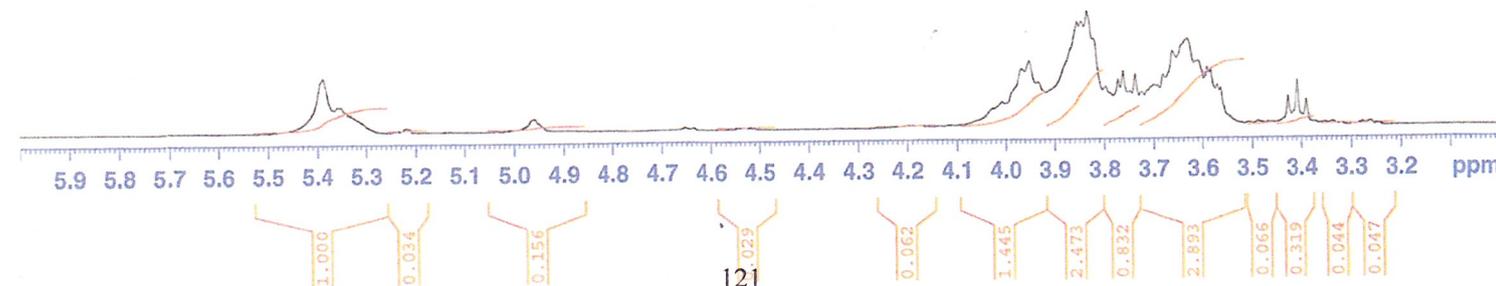
DDS P#3, 25mg/0.6mg, D2O, 298K, Bruker AVANCE500



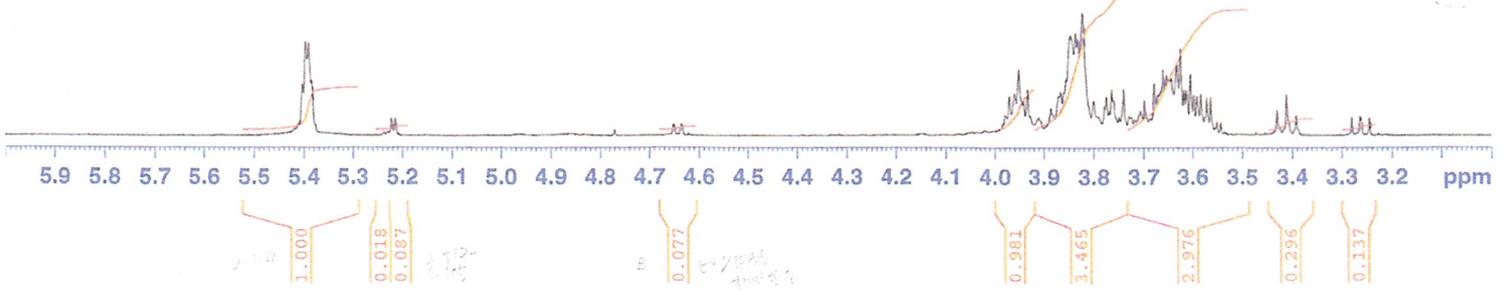
DDS P#4, 29mg/0.6mg, D2O, 298K, Bruker AVANCE500



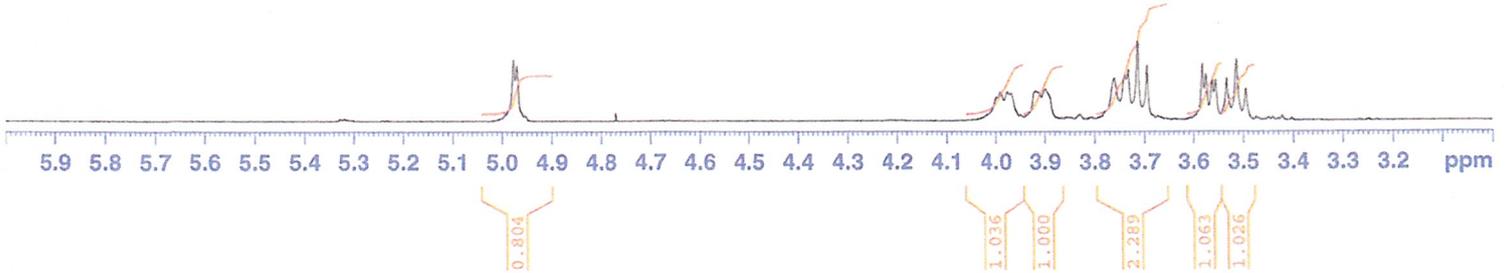
DDS P#5, 57mg/0.6mg, D2O, 298K, Bruker AVANCE500



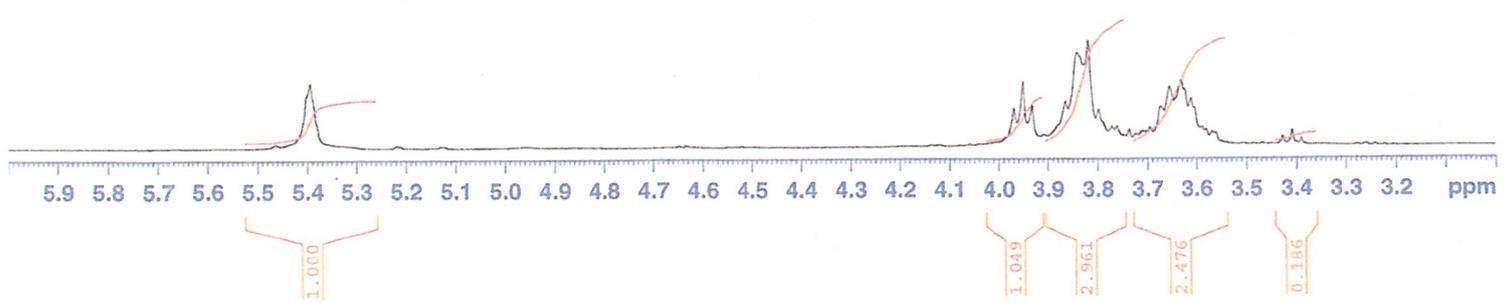
Fuji-Oligo G67, 12.9mg/0.6mL, D2O, 298K, Bruker AVANCE500



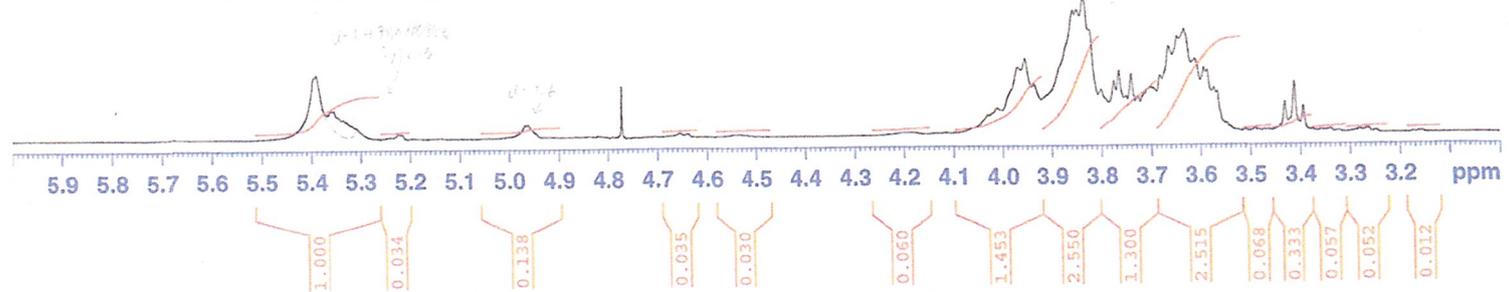
STD DX, 20mg/0.6mL, D2O, 298K, Bruker AVANCE500



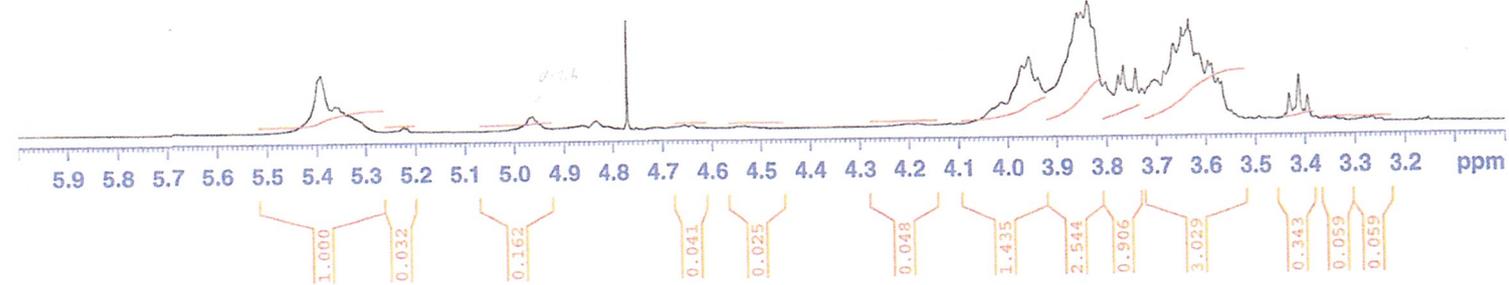
STD SDX, 20mg/0.6mL, D2O, 298K, Bruker AVANCE500



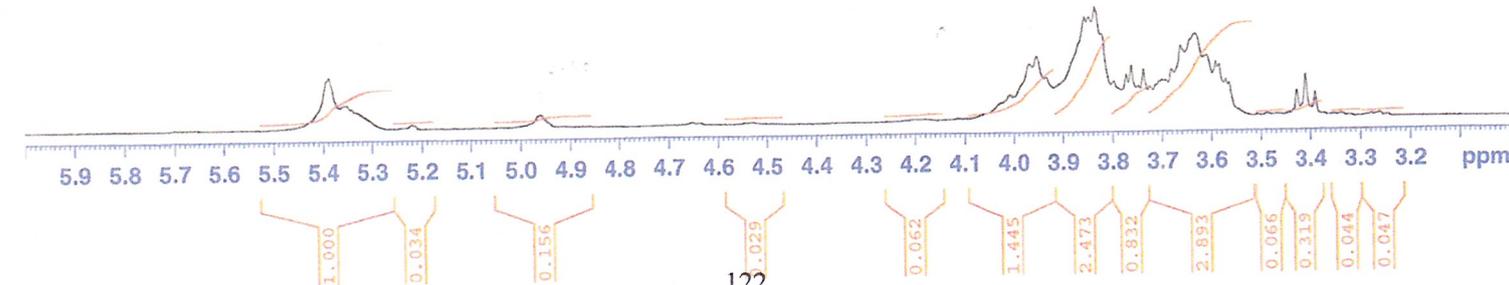
DDS P#3, 25mg/0.6mL, D2O, 298K, Bruker AVANCE500



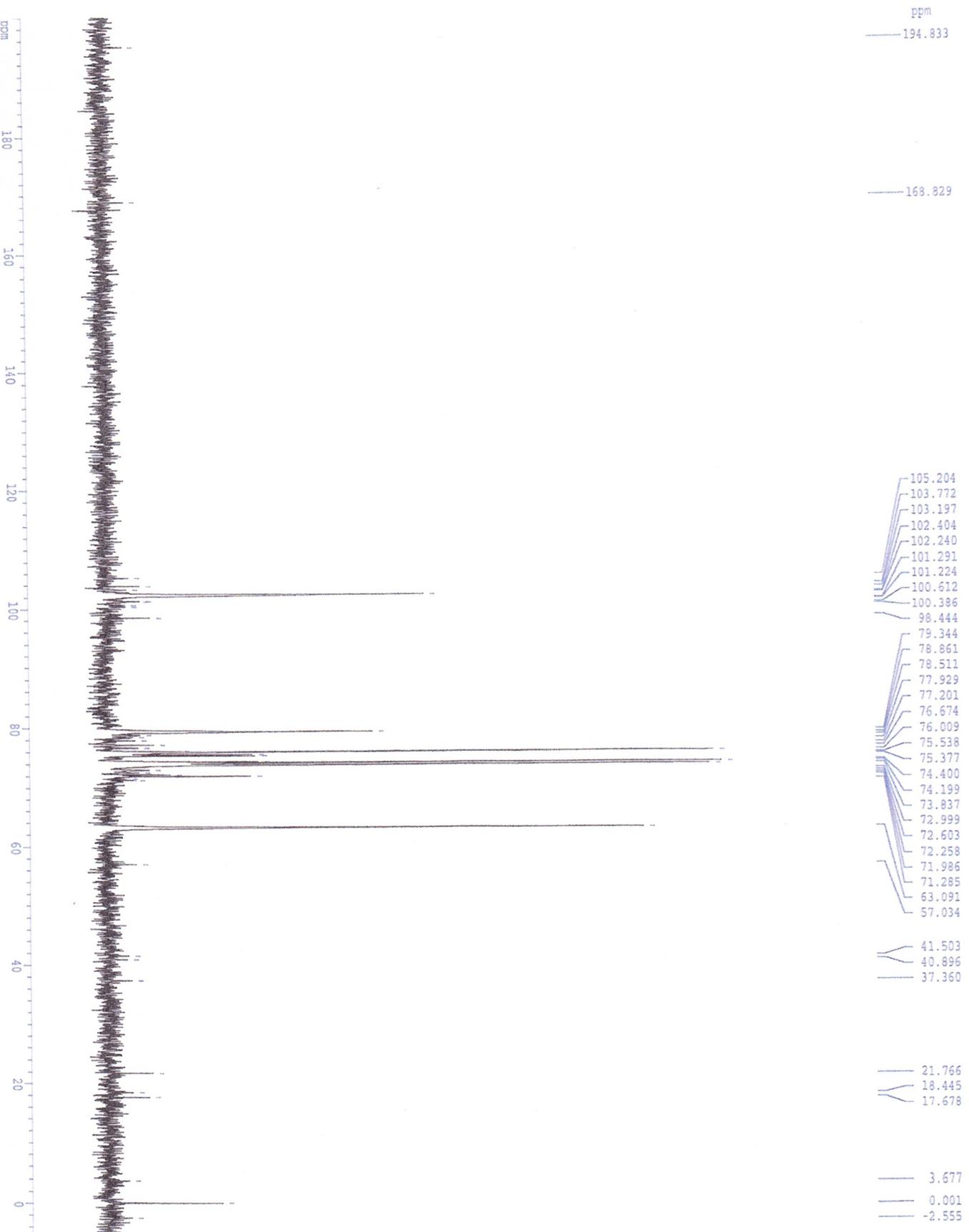
DDS P#4, 29mg/0.6mL, D2O, 298K, Bruker AVANCE500



DDS P#5, 57mg/0.6mL, D2O, 298K, Bruker AVANCE500



STD SDX, 20mg/0.6mg, D2O, 298K, Bruker AVANCE500



- 105.204
- 103.772
- 103.197
- 102.404
- 102.240
- 101.291
- 101.224
- 100.612
- 100.386
- 98.444
- 79.344
- 78.861
- 78.511
- 77.929
- 77.201
- 76.674
- 76.009
- 75.538
- 75.377
- 74.400
- 74.199
- 73.837
- 72.999
- 72.603
- 72.258
- 71.986
- 71.285
- 63.091
- 57.034
- 41.503
- 40.896
- 37.360
- 21.766
- 18.445
- 17.678
- 3.677
- 0.001
- 2.555

Current Data Parameters  
 NAME funnel18  
 EXPNO 2  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20110906  
 Time 14.10

INSTRUM spect  
 PROBHD 5 mm CPDUI, 13C  
 PULPROG zgpg30  
 TD 65536  
 SOLVENT D2O

NS 256  
 DS 2  
 SWH 30303.031 Hz  
 FIDRES 0.462388 Hz  
 AQ 1.0814105 sec  
 RG 18390.4  
 DM 16.500 usec  
 DE 20.00 usec  
 TE 298.0 K

D1 2.0000000 sec  
 d11 0.0300000 sec  
 DELTA 1.8999998 sec  
 MCRST 0.0000000 sec  
 MCRK 0.0150000 sec

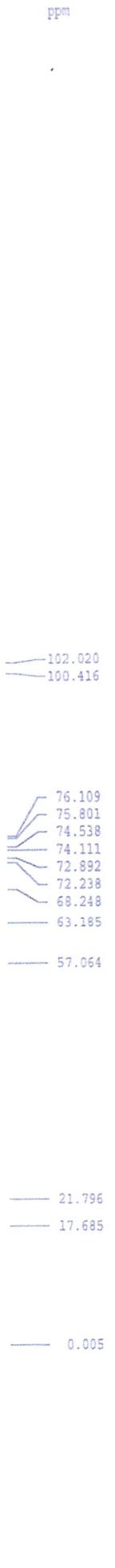
\*\*\*\*\* CHANNEL f1 \*\*\*\*\*  
 NUC1 13C  
 P1 10.00 usec  
 PL1 -2.30 dB  
 SFO1 125.7716224 MHz

\*\*\*\*\* CHANNEL f2 \*\*\*\*\*  
 CDPORGZ waltz16  
 NUC2 1H  
 PCPD2 80.00 usec  
 PL2 -5.70 dB  
 PL12 8.28 dB  
 PL13 8.28 dB  
 SFO2 500.1320005 MHz

F2 - Processing parameters  
 SI 65536  
 SF 125.7574497 MHz  
 NDM EM  
 SSB 0  
 LB 3.00 Hz  
 GB 0  
 PC 0.80

1D NMR plot parameters  
 CX 32.00 cm  
 CY 16.00 cm  
 FIP 200.000 DPM  
 FI 25151.49 Hz  
 F2P -5.000 ppm  
 PPM/CX -628.79 Hz  
 PPM/CM 6.40625 ppm/cm  
 HZ/CM 805.63367 Hz/cm

STD DX, 20mg/0.6mg, D2O, 298K, Bruker AVANCE500



Current Data Parameters  
NAME funanet17  
EXPNO 2  
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 20110906  
Time 12.55

INSTRUM spect  
PROBHD 5 mm CPDPL 13C  
PULPROG zgpg30  
TD 65536  
SOLVENT D2O

NS 256  
DS 2  
SWH 30303.031 Hz  
FIDRES 0.462388 Hz  
AQ 1.0914105 sec  
RG 11585.2  
DM 16.500 usec  
DE 20.00 usec  
TE 298.0 K

D1 2.00000000 sec  
d11 0.03000000 sec  
DELTA 1.89999998 sec  
MRESST 0.00000000 sec  
MCRRK 0.01500000 sec

===== CHANNEL F1 =====  
NUC1 13C  
P1 10.00 usec  
PL1 -2.30 dB  
SFO1 125.7716224 MHz

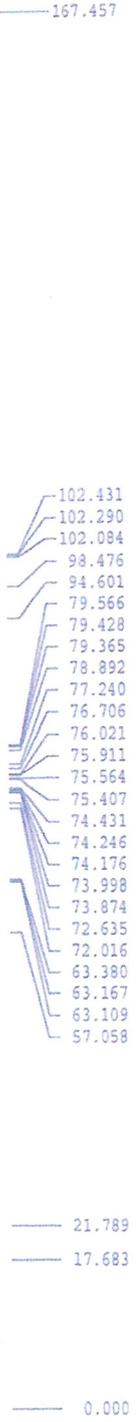
===== CHANNEL F2 =====  
CPDPRG2 waltz16  
NUC2 1H  
PCPD2 80.00 usec  
PL2 -5.70 dB  
PL12 8.28 dB  
PL13 8.28 dB  
SFO2 500.1320005 MHz

F2 - Processing parameters  
SI 65536  
SF 125.7714446 MHz  
WDW EM  
SSB 0  
LB 3.00 Hz  
GB 0  
PC 0.80

ID NMR plot parameters  
CX 32.00 cm  
CY 16.00 cm  
F1P 200.000 ppm  
F1 25151.49 Hz  
F2P -5.000 ppm  
P1PCW4 6.41625 ppm/cm  
HZCM 805.63367 Hz/cm

Fuji-Oligo 667, 12.9mg/0.6mL, D2O, 298K, Bruker AVANCE500

ppm



Current Data Parameters  
 NAME funame122  
 EXPNO 2  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20110908  
 Time 13.17  
 INSTRUM spect  
 PROBRD 5 mm CPYD1, 13C  
 PULPROG zgpg30  
 TD 65536  
 SOLVENT D2O  
 NS 256  
 DS 2

SMH 30303.031 Hz  
 FIDRES 0.462388 Hz  
 AQ 1.0814105 sec  
 RG 18390.4  
 TM 16.500 usec  
 DE 20.00 usec  
 TE 298.0 K  
 D1 2.00000000 sec  
 d11 0.03000000 sec  
 DELTA 1.89999998 sec  
 ACQRESPT 0.00000000 sec  
 MCWK 0.01500000 sec

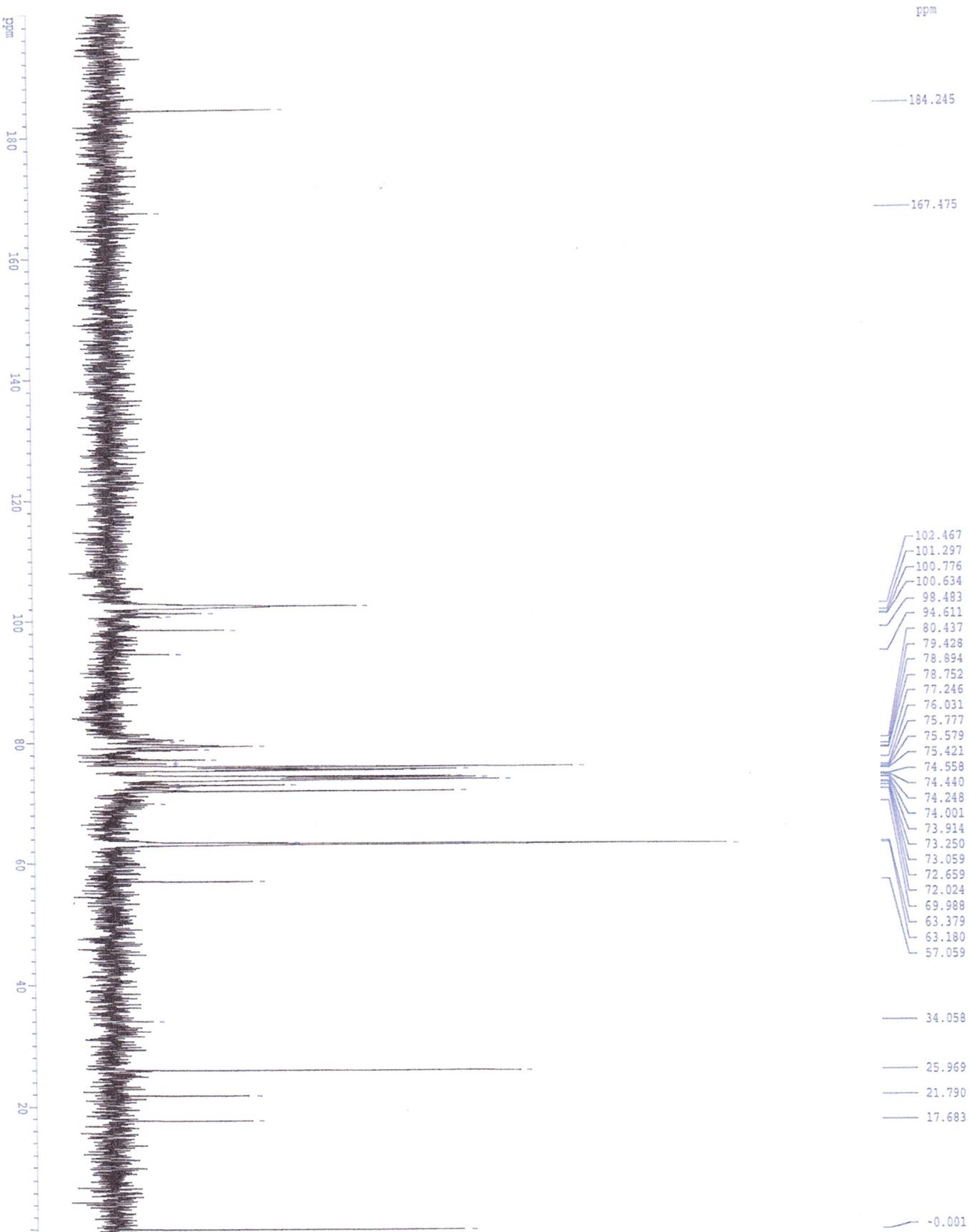
===== CHANNEL f1 =====  
 NUC1 13C  
 P1 10.00 usec  
 PL1 -2.30 dB  
 SFO1 125.7716224 MHz

===== CHANNEL f2 =====  
 CPDPRG2 waltz16  
 NUC2 1H  
 PCPD2 80.00 usec  
 PL2 -5.70 dB  
 PL12 8.28 dB  
 PL13 8.28 dB  
 SFO2 500.1320005 MHz

F2 - Processing parameters  
 SI 65536  
 SF 125.7574456 MHz  
 FIDM EM  
 SSB 0  
 LB 3.00 Hz  
 GB 0  
 PC 0.80

ID NMR plot parameters  
 CX 32.00 cm  
 CY 16.00 cm  
 FIP 200.000 ppm  
 F1 25151.49 Hz  
 F2P -5.000 ppm  
 F2 -628.79 Hz  
 PPMCM 6.40625 ppm/cm  
 HZCM 805.63367 Hz/cm

DDS P#3, 25mg/0.6mg, D2O, 298K, Bruker AVANCE500



- 102.467
- 101.297
- 100.776
- 100.634
- 98.483
- 94.611
- 80.437
- 79.428
- 78.894
- 78.752
- 77.246
- 76.031
- 75.777
- 75.579
- 75.421
- 74.558
- 74.440
- 74.248
- 74.001
- 73.914
- 73.250
- 73.059
- 72.659
- 72.024
- 69.988
- 63.379
- 63.180
- 57.059
- 34.058
- 25.969
- 21.790
- 17.683
- 0.001

Current Data Parameters  
 NAME funanel19  
 EXPNO 2  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20110906  
 Time 14.55  
 INSTRUM spect  
 PROBHD 5 mm CPDUL 13C  
 PULPROG zgpg30  
 TD 65536  
 SOLVENT D2O  
 NS 1024  
 DS 2

SWH 30303.031 Hz  
 FIDRES 0.462388 Hz  
 AQ 1.0814105 sec  
 RG 18390.4  
 DN 16.500 usec  
 DE 20.00 usec  
 TE 298.0 K

D1 2.00000000 sec  
 d11 0.03000000 sec  
 DELTA 1.89999998 sec  
 MCRESST 0.00000000 sec  
 MCPRK 0.01500000 sec

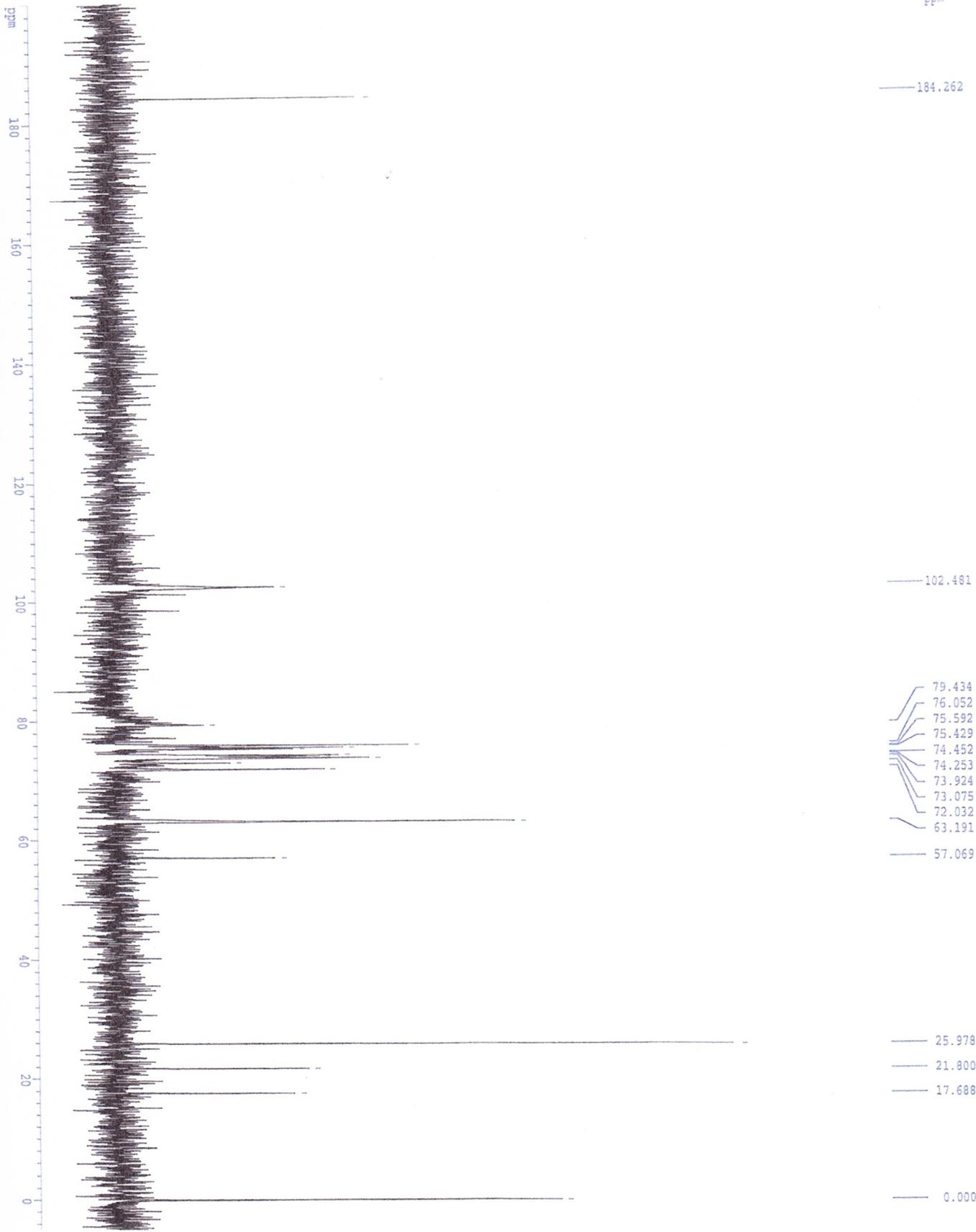
==== CHANNEL f1 =====  
 NUC1 13C  
 P1 10.00 usec  
 PL1 -2.30 dB  
 SF01 125.7716224 MHz

==== CHANNEL f2 =====  
 CPDPRG2 waltz16  
 NUC2 1H  
 PCPD2 80.00 usec  
 PL2 -5.70 dB  
 PL12 8.28 dB  
 PL13 8.28 dB  
 SF02 500.1320005 MHz

F2 - Processing parameters  
 SI 65536  
 SF 125.7574451 MHz  
 WDM EM  
 SSB 0  
 LB 3.00 Hz  
 GB 0  
 PC 0.80

1D NMR plot parameters  
 CX 32.00 cm  
 CY 16.00 cm  
 F1P 200.000 ppm  
 F1 25151.49 Hz  
 F2P -0.500 ppm  
 F2 -62.88 Hz  
 FWHM 6.26562 ppm/cm  
 HZCM 787.94997 Hz/cm

DDS P#4, 29mg/0.6mg, D2O, 298K, Bruker AVANCE500



- 184.262
- 102.481
- 79.434
- 76.052
- 75.592
- 75.429
- 74.452
- 74.253
- 73.924
- 73.075
- 72.032
- 63.191
- 57.069
- 25.978
- 21.800
- 17.688
- 0.000

Current Data Parameters  
 NAME funancl20  
 EXNO 2  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20110906  
 Time 15.30

INSTRUM spect  
 PROBD 5 mm CPDUL13C  
 PULPROG zgpg30  
 TD 65536  
 SOLVENT D2O  
 NS 1024

DS 2  
 SWH 30303.031 Hz  
 FIDRES 0.462388 Hz  
 AQ 1.0814105 sec  
 RG 18390.4

DM 16.500 usec  
 DE 20.00 usec  
 TE 298.0 K  
 D1 2.00000000 sec  
 d11 0.03000000 sec

DELTA 1.89999998 sec  
 NCREST 0.00000000 sec  
 MCPRK 0.01500000 sec

==== CHANNEL f1 =====  
 NUC1 13C  
 P1 10.00 usec  
 PL1 -2.30 dB  
 SFO1 125.7716224 MHz

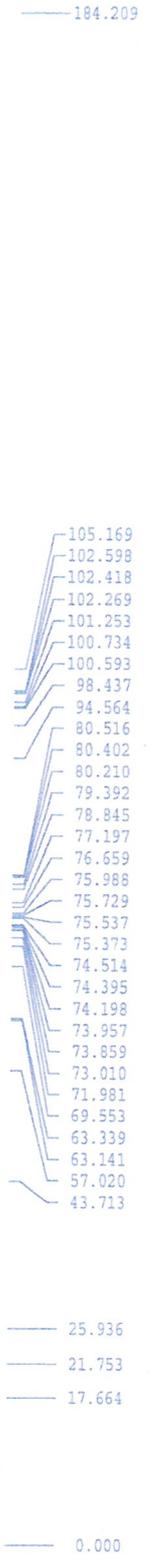
==== CHANNEL f2 =====  
 CPDPRG2 waltz16  
 NUC2 1H  
 PCPD2 80.00 usec  
 PL2 -5.70 dB  
 PL12 8.28 dB  
 PL13 8.28 dB  
 SFO2 500.132005 MHz

F2 - Processing parameters  
 SI 65536  
 SF 125.7574437 MHz  
 MDW EM  
 SSB 0  
 LB 3.00 Hz  
 GB 0  
 PC 0.80

1D NMR plot parameters  
 CX 32.00 cm  
 CY 16.00 cm  
 F1P 200.000 ppm  
 F1 25151.49 Hz  
 F2P -5.000 ppm  
 F2 -628.79 Hz  
 ZPMCM 6.40625 ppm/cm  
 HZCM 805.6367 Hz/cm

DDS P#5, 57mg/0.6mg, D2O, 298K, Bruker AVANCE500

ppm



Current Data Parameters  
 NAME funan121  
 EXPNO 2  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20110906  
 Time 16.32

INSTRUM spect  
 PROBD 5 mm CPDUL 13C  
 PULPROG zgpg30  
 TD 65536  
 SOLVENT D2O  
 NS 512  
 DS 2

SWH 30303.031 Hz  
 FIDRES 0.462388 Hz  
 AQ 1.0814105 sec  
 RG 18390.4  
 DW 16.500 usec  
 DE 20.00 usec  
 TE 298.0 K

D1 2.00000000 sec  
 d11 0.03000000 sec  
 DELTA 1.89999998 sec  
 INCRST 0.00000000 sec  
 MCWPK 0.01500000 sec

==== CHANNEL f1 =====  
 NUC1 13C  
 P1 10.00 usec  
 PL1 -2.30 dB  
 SFO1 125.7716224 MHz

==== CHANNEL f2 =====  
 CPDPRG2 waltz16  
 NUC2 1H  
 PCPD2 1H  
 PL2 80.00 usec  
 PL2 -5.70 dB  
 PL12 8.28 dB  
 PL13 8.28 dB  
 SFO2 500.1320005 MHz

F2 - Processing parameters  
 SI 65536  
 SF 125.7574506 MHz  
 WDM EM  
 SSB 0  
 LB 3.00 Hz  
 GB 0  
 PC 0.80

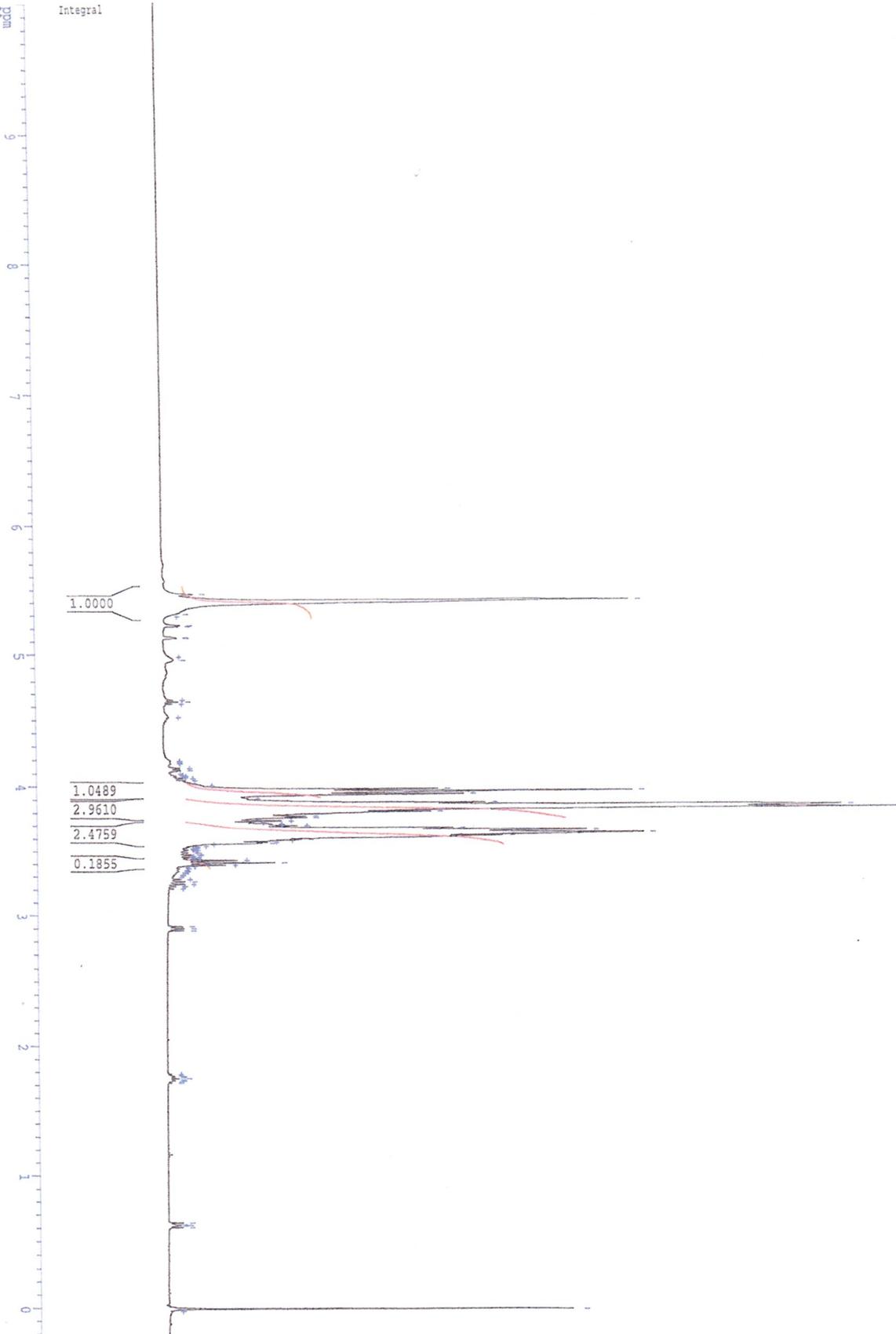
ID NMR plot parameters

CX 32.00 cm  
 CY 16.00 cm  
 R1P 200.000 ppm  
 F1 25151.49 Hz  
 F2P -5.000 ppm  
 F2 -628.79 Hz  
 PPKCM 6.40625 ppm/cm  
 HZCM 805.6367 Hz/cm

STD SDX, 20mg/0.6mg, D2O, 298K, Bruker AVANCE500

ppm

5.4628  
5.3936  
5.3055  
5.2173  
5.2102  
5.1300  
5.1236  
4.9576  
4.6476  
4.6335  
4.1209  
3.9691  
3.9505  
3.9316  
3.8643  
3.8408  
3.8286  
3.8190  
3.7976  
3.7708  
3.7605  
3.6719  
3.6539  
3.6311  
3.6240  
3.6111  
3.6042  
3.5887  
3.5610  
3.4082  
3.2599  
2.9180  
2.9024  
2.8864  
1.7703  
1.7627  
1.7541  
1.7454  
1.7378  
1.7325  
1.7215  
0.6419  
0.6298  
0.6245  
0.6199  
0.6079  
0.0067  
0.0001  
-0.0065  
-0.0185



Current Data Parameters  
NAME funane118  
EXPNO 1  
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 2010906  
Time 13.28

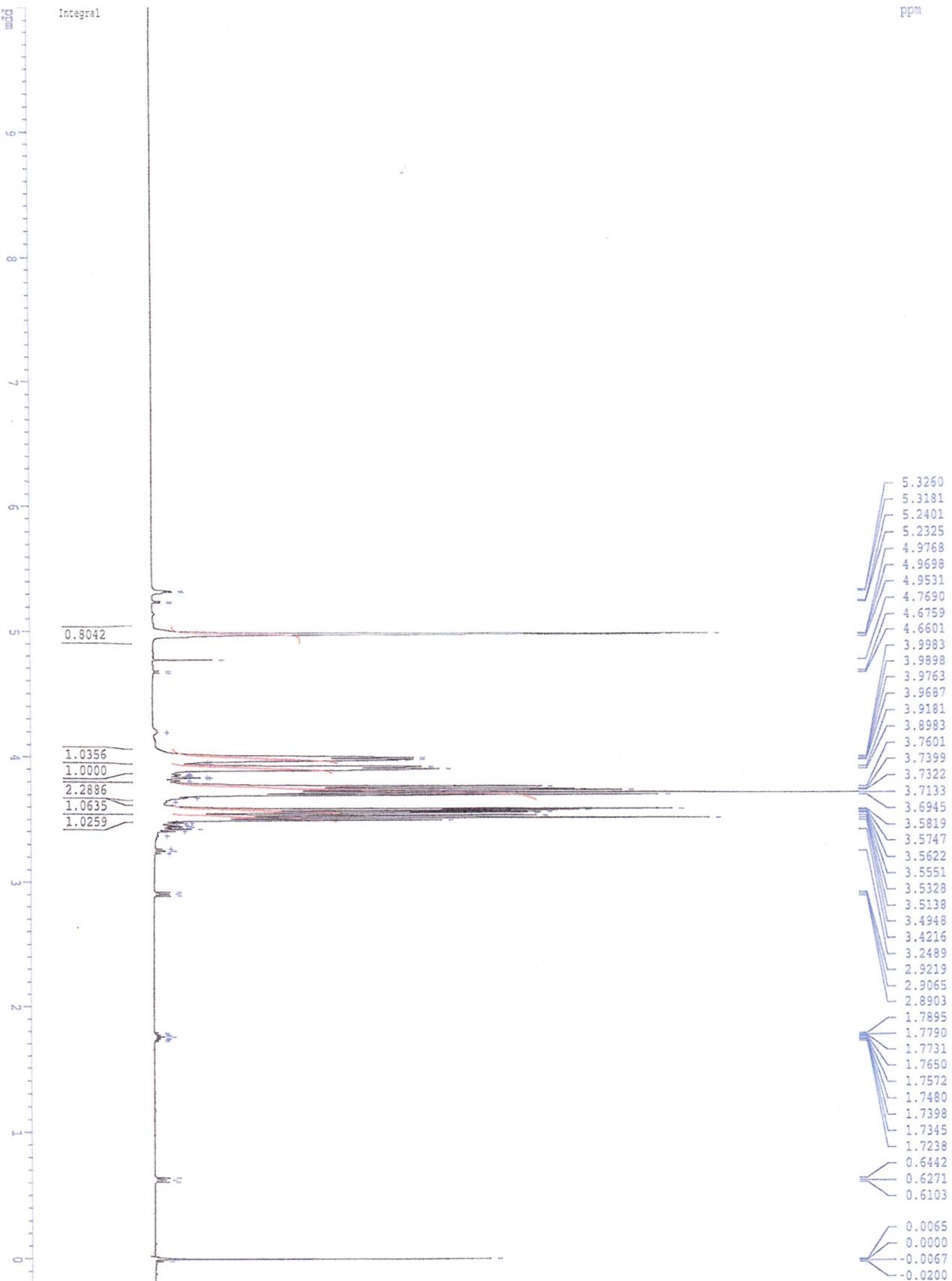
INSTRUM spect  
PROBHD 5 mm CPDJI 13C  
PULPROG zgpr  
TD 65536  
SOVENT D2O  
NS 4  
DS 2  
SWH 6009.615 Hz  
FIDRES 0.091699 Hz  
AQ 5.4527283 sec  
RG 32  
DE 83.200 usec  
TE 298.0 K  
DI 2.00000000 sec  
d12 0.00002000 sec  
MCREST 0.00000000 sec  
MCWRRK 0.01500000 sec

==== CHANNEL f1 =====  
NUC1 1H  
P1 15.00 usec  
PL1 -5.80 dB  
P19 44.76 dB  
SFO1 500.1323520 MHz

F2 - Processing Parameters  
SI 65536  
SF 500.1299683 MHz  
WDW EM  
SSB 0  
LB 0.00 Hz  
GB 0  
PC 1.00

ID NMR plot parameters  
CX 32.00 cm  
CY 18.00 cm  
FLP 10.000 ppm  
F1 5001.30 Hz  
F2 -0.200 ppm  
FZ -100.03 Hz  
PPMCM 0.31875 ppm/cm  
HZCM 159.41643 Hz/cm

STD DX, 20mg/0.6mg, D2O, 298K, Bruker AVANCE500



Current Data Parameters  
 NAME funane117  
 EXPMO 1  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20110906  
 Time\_ 12.49

INSTRUM spect  
 PROBRD 5 mm CPDUI 13C  
 PULPROG zgpg3  
 TD 65536  
 SOLVENT D2O

NS 4  
 DS 2  
 SWH 6009.615 Hz  
 FIDPRS 0.091699 Hz  
 AQ 5.4527283 sec

RG 64  
 DW 83.200 usec  
 DE 6.00 usec  
 TE 298.0 K

D1 2.00000000 sec  
 d12 0.00002000 sec  
 MCREST 0.00000000 sec  
 MCWRK 0.01500000 sec

==== CHANNEL F1 =====  
 NUC1 1H

P1 15.00 usec  
 P11 -5.80 dB  
 P19 44.76 dB  
 SFO1 500.1323529 MHz

F2 - Processing parameters  
 SI 65536  
 SF 500.129674 MHz

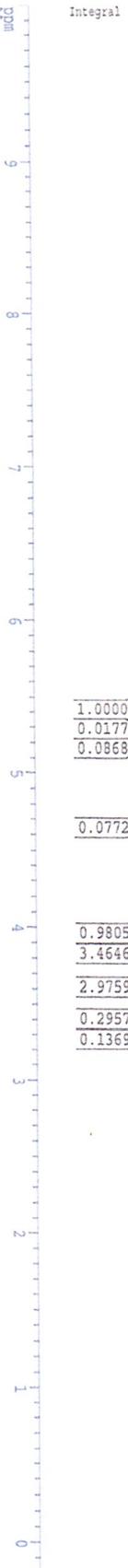
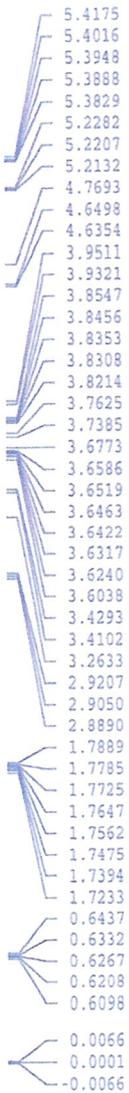
WDW EM  
 SSB 0  
 LB 0.00 Hz  
 GB 0  
 PC 1.00

ID NMR plot parameters  
 CX 32.00 cm  
 CY 18.00 cm  
 F1P 10.000 ppm  
 F1 5001.30 Hz  
 F2P -0.200 ppm

F2 -100.03 Hz  
 PRICM 0.31875 ppm/cm  
 HZCM 159.41643 Hz/cm

Fuji-Oligo G67, 12.9mg/0.6mL, D2O, 298K, Bruker AVANCE500

ppm



Current Data Parameters  
 NAME funane122  
 EXPNO 1  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20110908  
 Time\_ 13.11

INSTRUM spect  
 PROBHD 5 mm CPDUL 13C  
 PULPROG zgpg  
 TD 65536  
 SOLVENT D2O  
 NS 16  
 DS 0

SWH 6009.615 Hz  
 FIDRES 0.091699 Hz  
 AQ 5.4527283 sec  
 RG 64  
 DW 83.200 usec  
 DE 6.00 usec  
 TE 298.0 K

D1 2.00000000 sec  
 d12 0.00002000 sec  
 ACRESST 0.00000000 sec  
 MCWRK 0.01500000 sec

==== CHANNEL f1 =====  
 NUC1 1H  
 P1 15.00 usec  
 PL1 -5.80 dB  
 PL9 44.76 dB  
 SFO1 500.1323521 MHz

F2 - Processing parameters  
 SI 65536  
 SF 500.1299671 MHz  
 WDW EM  
 SSB 0  
 LB 0.00 Hz  
 GB 0  
 PC 1.00

1D NMR plot parameters  
 CX 32.00 cm  
 CY 16.00 cm  
 F1P 10.000 ppm  
 F1 5001.30 Hz  
 F2P -0.200 ppm  
 F2 -100.03 Hz  
 PPM/CM 0.31875 ppm/cm  
 HZ/CM 159.41643 Hz/cm

DDS P#3, 25mg/0.6mg, D2O, 298K, Bruker AVANCE500

ppm

- 5.3897
- 5.3600
- 5.3540
- 5.3446
- 5.3348
- 5.2227
- 5.2159
- 4.9625
- 4.7719
- 4.6537
- 4.6375
- 3.9690
- 3.9538
- 3.8568
- 3.8491
- 3.8366
- 3.8245
- 3.7746
- 3.7646
- 3.7403
- 3.6820
- 3.6633
- 3.6466
- 3.6325
- 3.6183
- 3.6110
- 3.5928
- 3.5861
- 3.4310
- 3.4121
- 2.9217
- 2.9065
- 2.8901
- 1.9105
- 1.9052
- 1.9047
- 1.9008
- 1.9000
- 1.8966
- 1.8963
- 1.8959
- 1.7721
- 1.7567
- 1.1683
- 0.6439
- 0.6269
- 0.6100
- 0.0066
- 0.0001
- 0.0065

Integral

- 1.0000
- 0.0338
- 0.1384
- 0.0354
- 0.0295
- 0.0604
- 1.4527
- 2.5496
- 1.2995
- 2.5148
- 0.0681
- 0.3334
- 0.0566
- 0.0518
- 0.0119
- 0.3588



Current Data Parameters  
 NAME funanel19  
 EXNO 1  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date 20110906  
 Time 14.40

INSTRUM spect  
 PROBHD 5 mm CPDUL 13C  
 PULPROG zgpr  
 TD 65536  
 SOLVENT D2O  
 NS 4  
 DS 2

SMH 600.615 Hz  
 FIDRES 0.091699 Hz  
 AQ 5.4527283 sec  
 RG 64  
 DW 83.200 usec  
 DE 6.00 usec  
 TE 298.0 K

D1 2.00000000 sec  
 d12 0.00002000 sec  
 MCRES1 0.00000000 sec  
 MCNR1 0.01500000 sec

==== CHANNEL F1 =====  
 NUC1 1H

P1 15.00 usec  
 PL1 -5.80 dB  
 PL9 44.76 dB  
 SFO1 500.1323530 MHz

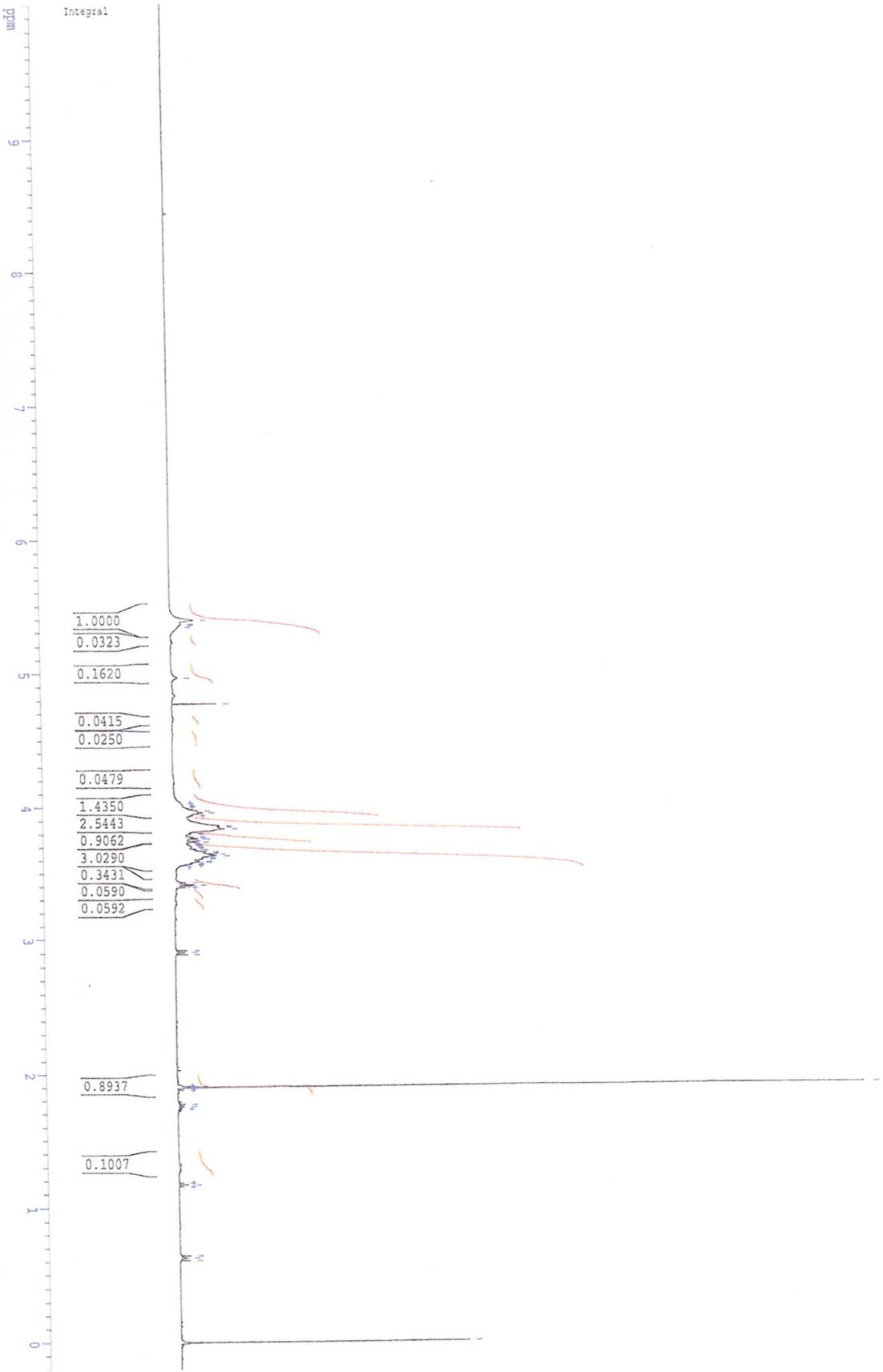
F2 - Processing parameters  
 SI 65536  
 SF 500.1299663 MHz  
 MDW EM  
 SSB 0  
 LB 0.00 Hz  
 GB 0  
 PC 1.00

ID NMR plot parameters  
 CX 32.00 cm  
 CY 16.00 cm  
 FIP 10.000 ppm  
 FI 5001.30 Hz  
 F2P -0.200 ppm  
 F2 -100.03 Hz  
 PPMCM 0.31875 ppm/cm  
 HZCM 159.41643 Hz/cm

DDS P#4, 29mg/0.6mg, D2O, 298K, Bruker AVANCE500

ppm

- 5.3911
- 5.3605
- 5.3544
- 5.3463
- 5.3358
- 4.9628
- 4.7716
- 3.9699
- 3.9550
- 3.8579
- 3.8498
- 3.8376
- 3.7656
- 3.7412
- 3.6834
- 3.6645
- 3.6616
- 3.6523
- 3.6474
- 3.6332
- 3.6190
- 3.6120
- 3.5938
- 3.5868
- 3.4320
- 3.4129
- 2.9223
- 2.9071
- 2.8907
- 1.9077
- 1.9070
- 1.9055
- 1.9016
- 1.8981
- 1.8977
- 1.8973
- 1.8970
- 1.7728
- 1.7573
- 1.1689
- 0.6443
- 0.6273
- 0.6103
- 0.0065
- 0.0000
- 0.0067



Current Data Parameters  
 NAME funane120  
 EXPRNO 1  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20110906  
 Time 15.16

INSTRUM spect  
 PROBHD 5 mm CPDUL 13C  
 PULPROG zgpg  
 TD 65536  
 SOLVENT D2O  
 NS 16  
 DS 2

SMH 6009.615 Hz  
 FIDRES 0.091699 Hz  
 AQ 5.4527283 sec  
 RG 114  
 DM 83.200 usec  
 DE 6.00 usec  
 TE 298.0 K

DI 2.00000000 sec  
 d12 0.00002000 sec  
 MCREST 0.00000000 sec  
 MCORR 0.01500000 sec

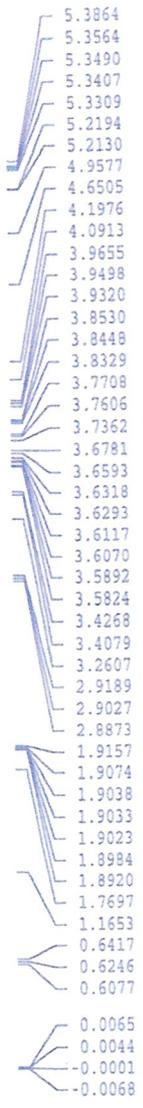
==== CHANNEL f1 =====  
 NUCL1 1H  
 P1 15.00 usec  
 PL1 -5.80 dB  
 PL9 44.76 dB  
 SFO1 500.1323531 MHz

F2 - Processing parameters  
 SI 65536  
 SF 500.1299663 MHz  
 MDW EM  
 SSB 0  
 LB 0.00 Hz  
 GB 0  
 PC 1.00

ID NMR plot parameters  
 CX 32.00 cm  
 CY 16.00 cm  
 F1P 10.000 ppm  
 F1 5001.30 Hz  
 F2P -0.200 ppm  
 F2 -100.03 Hz  
 PPMCM 0.31875 ppm/cm  
 HZCM 159.41643 Hz/cm

DDS E#5, 57mg/0.6mg, D2O, 298K, Bruker AVANCE500

ppm



Current Data Parameters  
 NAME funane121  
 EXPNO 1  
 PROCNO 1

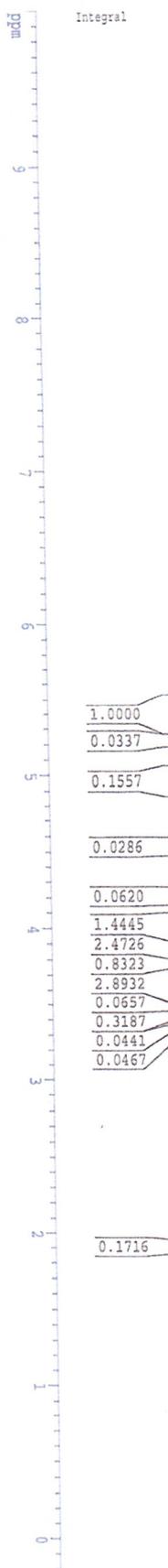
F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20110906  
 Time 16.29

INSTRUM spect  
 PROBHD 5 mm CPDUL 13C  
 PULPROG zgpg3  
 TD 65536  
 SOLVENT D2O  
 NS 16  
 DS 2  
 SWH 6009.615 Hz  
 FIDRES 0.091699 Hz  
 AQ 5.4527283 sec  
 RG 20.2  
 DM 83.200 usec  
 DE 6.00 usec  
 TE 298.0 K  
 D1 2.00000000 sec  
 d12 0.00002000 sec  
 ICREST 0.00000000 sec  
 MCPRK 0.01500000 sec

==== CHANNEL f1 =====  
 NUC1 1H  
 P1 15.00 usec  
 PL1 -5.80 dB  
 PL9 44.76 dB  
 SFO1 500.1323524 MHz

F2 - Processing parameters  
 SI 65536  
 SF 500.1299666 MHz  
 WDW EM  
 SSB 0  
 LB 0.00 Hz  
 GB 0  
 PC 1.00

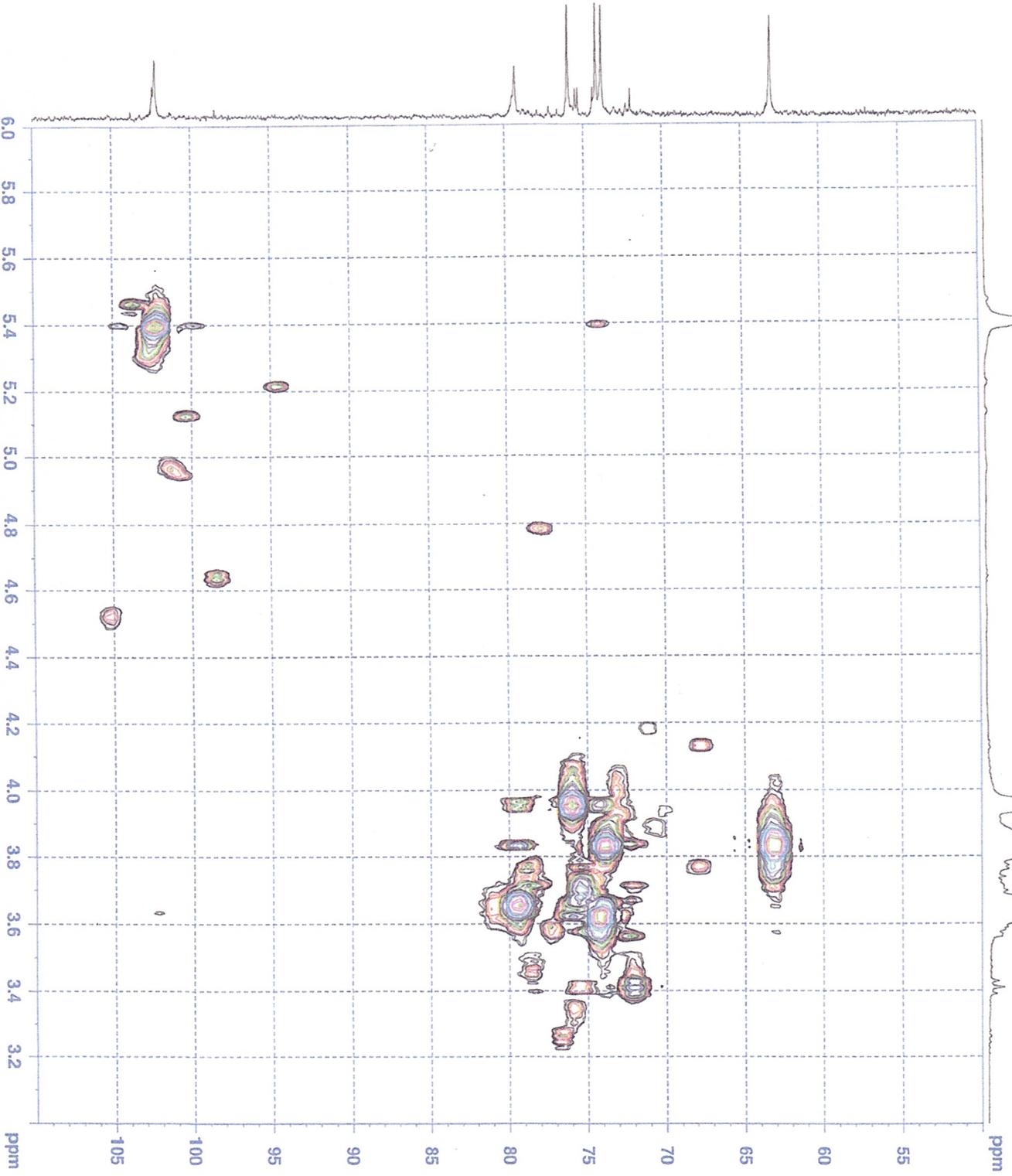
ID NMR plot parameters  
 CX 32.00 cm  
 CY 16.00 cm  
 F1P 10.000 ppm  
 F1 5001.30 Hz  
 F2P -0.200 ppm  
 F2 -100.03 Hz  
 PPMCM 0.31875 ppm/cm  
 HZCM 159.41643 Hz/cm



STD SDX, 20mg/0.6mL, D2O, 298K, Bruker AVANCE500



HSQC



```

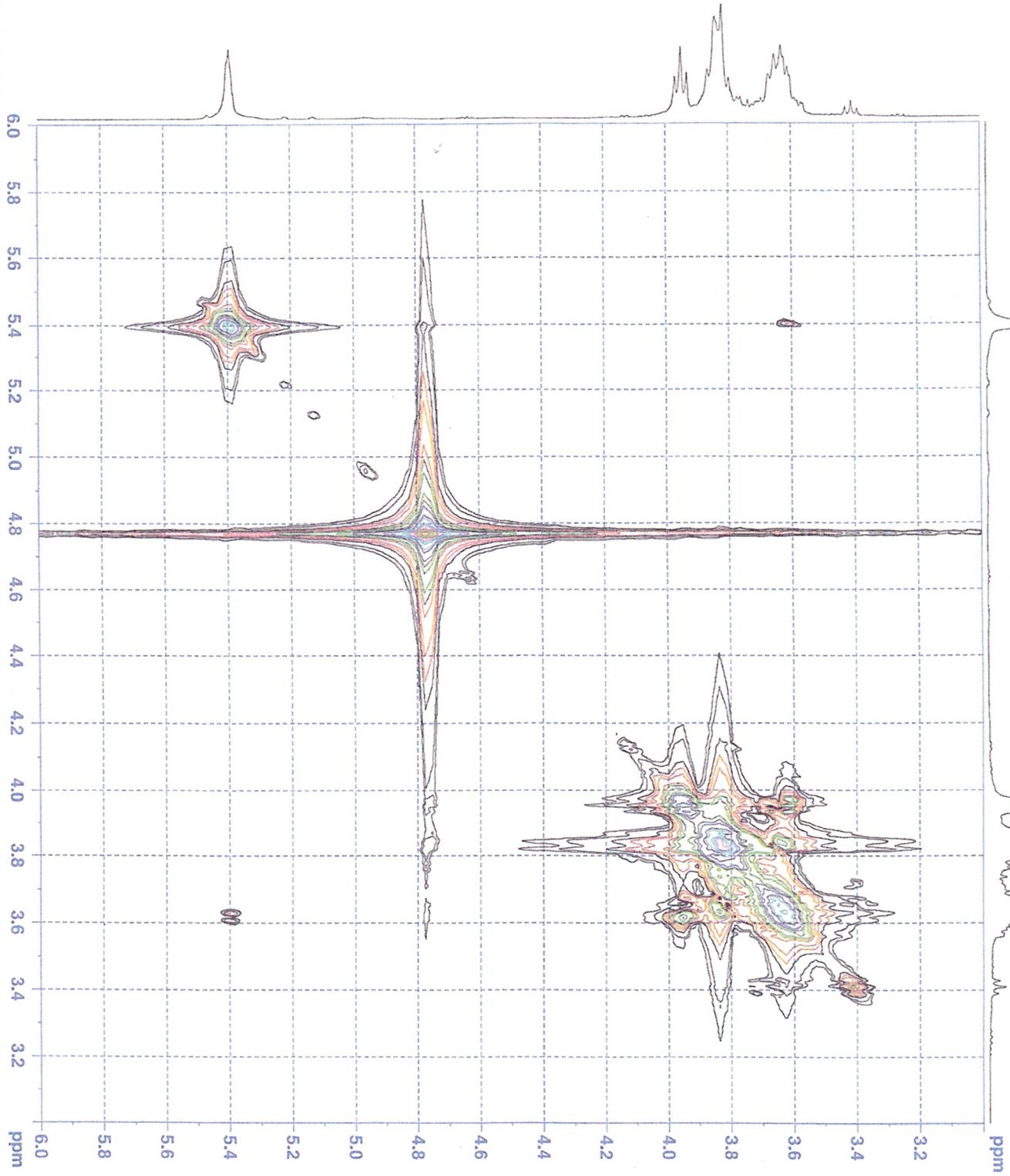
Current: Data parameters
Name: STDSDX
PROCNO: 1
F2 - Acquisition parameters
Date_: 20110804
Time: 12.54
INSTRUM: spect
PROBHD: zgpg30
PULPROG: zgpg30
PCPRG2: hsqc
AQ: 0.10000000
RG: 655.35
WDW: EM
SSB: 0
LB: 3.00
GB: 0
PC: 0
DC: 0
SC: 0
TC: 0
EC: 0
AS: 0
SI: 0
SF: 500.1364610
FIDRES: 0.000183
AQRES: 0.000183
SFO: 125.7614500
F2 - Processing parameters
SI: 32768
SF: 500.1364610
WDW: EM
SSB: 0
LB: 3.00
GB: 0
PC: 0
DC: 0
SC: 0
TC: 0
EC: 0
AS: 0
SI: 0
F2 - Acquisition parameters
Name: STDSDX
PROCNO: 1
F2 - Acquisition parameters
Date_: 20110804
Time: 12.54
INSTRUM: spect
PROBHD: zgpg30
PULPROG: zgpg30
PCPRG2: hsqc
AQ: 0.10000000
RG: 655.35
WDW: EM
SSB: 0
LB: 3.00
GB: 0
PC: 0
DC: 0
SC: 0
TC: 0
EC: 0
AS: 0
SI: 0
SF: 500.1364610
FIDRES: 0.000183
AQRES: 0.000183
SFO: 125.7614500
F2 - Processing parameters
SI: 32768
SF: 500.1364610
WDW: EM
SSB: 0
LB: 3.00
GB: 0
PC: 0
DC: 0
SC: 0
TC: 0
EC: 0
AS: 0
SI: 0

```

STD SDX, 20mg/0.6mL, D2O, 298K, Bruker AVANCE500



COSY



```

Current Data Parameters
NAME          funme119
EXPNO         12
PROCNO        1

F2 - Acquisition Parameters
Date_         20110908
Time          18.17
INSTRUM      spect
PROBHD       5 mm CPDPL 11C
PULPROG      cosypp4f
TD           2048
SOLVENT      CDCl3
NS           16
DS           1
AQ           304.868 Hz
FIDRES       1.467191 Hz
AQ           0.3410036 sec
RG           40.3
DE           166.480 usec
TE           298.0 K
D0           0.00000380 sec
d1           2.00000080 sec
d11          0.00000080 sec
D12          0.00010080 sec
IND          0.00033280 sec
MCKEYEST     0.00000080 sec
MCKERR       2.00000080 sec

***** CHANNEL f1 *****
NUC1          1H
P0           14.00 usec
PL1          16.00 dB
PL2          -5.80 dB
SFO1         500.132506 MHz

***** GRADIENT CHANNEL *****
GRANA1       SINE.100
SINE.100    SINE.100
GRPA2        0.00 %
GPX2         0.00 %
GPY1         0.00 %
GPY2         0.00 %
GZ21        10.00 %
GZ22        10.00 %
P16          1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
MD0          1
TD           133
SFO1         500.1323 MHz
FIDRES       23.475060 Hz
SN           6.088 ppm
PNAME0      0F

F2 - Processing parameters
SI           500.129683 MHz
WDW          GEM2
SSB          2
LB           0.00 Hz
GB           0
PC           1.40

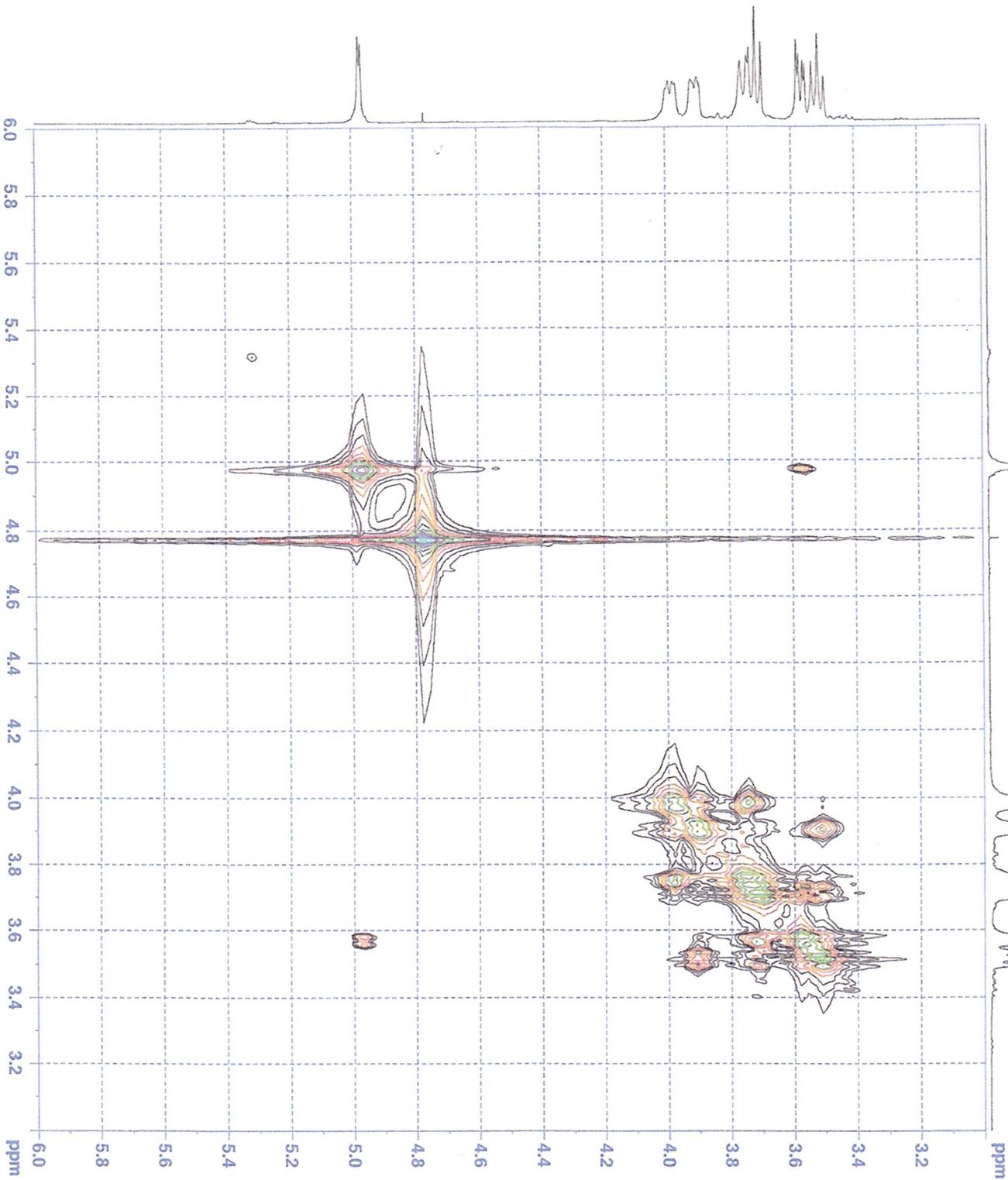
F1 - Processing parameters
SI           256
MC2          500.129683 MHz
SF           500.129683 MHz
WDW          QSHINE
SSB          2
LB           0.00 Hz
GB           0
  
```





STD DX, 20mg/0.6mL, D2O, 298K, Bruker AVANCE500

4971.9 140



COSY



```

Current Data Parameters
NAME          funanell7
EXPNO        12
PROCNO       1
----- Acquisition Parameters
Date_         20110908
Time         17.02
INSTRUM      spect
PROBHD       5 mm CPDPL113C
PULPROG      zgpg30
TD           2048
SOLVENT      CDCl3
NS           4
DS           16
SWH          3004.88 Hz
FIDRES      1.467191 Hz
AQ           0.3410036 sec
RG           40.3
DE           166.480 usec
TE           298.0 K
D0           0.00000360 sec
d1           2.00000000 sec
d13          0.00002480 sec
d16          0.00100000 sec
d19          0.00000000 sec
d2           0.00000000 sec
d3           2.00000000 sec
d5           0.00000000 sec
d6           2.00000000 sec
d7           0.00000000 sec
d8           2.00000000 sec
d9           2.00000000 sec
d10          0.00000000 sec
d11          0.00000000 sec
d12          0.00000000 sec
d14          0.00000000 sec
d15          0.00000000 sec
d17          0.00000000 sec
d18          0.00000000 sec
d19          0.00000000 sec
d20          0.00000000 sec
d21          0.00000000 sec
d22          0.00000000 sec
d23          0.00000000 sec
d24          0.00000000 sec
d25          0.00000000 sec
d26          0.00000000 sec
d27          0.00000000 sec
d28          0.00000000 sec
d29          0.00000000 sec
d30          0.00000000 sec
d31          0.00000000 sec
d32          0.00000000 sec
d33          0.00000000 sec
d34          0.00000000 sec
d35          0.00000000 sec
d36          0.00000000 sec
d37          0.00000000 sec
d38          0.00000000 sec
d39          0.00000000 sec
d40          0.00000000 sec
d41          0.00000000 sec
d42          0.00000000 sec
d43          0.00000000 sec
d44          0.00000000 sec
d45          0.00000000 sec
d46          0.00000000 sec
d47          0.00000000 sec
d48          0.00000000 sec
d49          0.00000000 sec
d50          0.00000000 sec
d51          0.00000000 sec
d52          0.00000000 sec
d53          0.00000000 sec
d54          0.00000000 sec
d55          0.00000000 sec
d56          0.00000000 sec
d57          0.00000000 sec
d58          0.00000000 sec
d59          0.00000000 sec
d60          0.00000000 sec
d61          0.00000000 sec
d62          0.00000000 sec
d63          0.00000000 sec
d64          0.00000000 sec
d65          0.00000000 sec
d66          0.00000000 sec
d67          0.00000000 sec
d68          0.00000000 sec
d69          0.00000000 sec
d70          0.00000000 sec
d71          0.00000000 sec
d72          0.00000000 sec
d73          0.00000000 sec
d74          0.00000000 sec
d75          0.00000000 sec
d76          0.00000000 sec
d77          0.00000000 sec
d78          0.00000000 sec
d79          0.00000000 sec
d80          0.00000000 sec
d81          0.00000000 sec
d82          0.00000000 sec
d83          0.00000000 sec
d84          0.00000000 sec
d85          0.00000000 sec
d86          0.00000000 sec
d87          0.00000000 sec
d88          0.00000000 sec
d89          0.00000000 sec
d90          0.00000000 sec
d91          0.00000000 sec
d92          0.00000000 sec
d93          0.00000000 sec
d94          0.00000000 sec
d95          0.00000000 sec
d96          0.00000000 sec
d97          0.00000000 sec
d98          0.00000000 sec
d99          0.00000000 sec
d100         0.00000000 sec
----- CHANNEL f1 *****
NUC1         1H
P0           14.00 usec
P1           16.00 usec
P2           -5.80 dB
P3           500.1322596 MHz
SF01         500.1322596 MHz
----- CHANNEL f2 *****
NAME        STD
PROCNO      10
P0          0.00 usec
P1          0.90 usec
P2          0.90 usec
P3          0.90 usec
P4          0.90 usec
P5          0.90 usec
P6          0.90 usec
P7          0.90 usec
P8          0.90 usec
P9          0.90 usec
P10         0.90 usec
P11         0.90 usec
P12         0.90 usec
P13         0.90 usec
P14         0.90 usec
P15         0.90 usec
P16         0.90 usec
P17         0.90 usec
P18         0.90 usec
P19         0.90 usec
P20         0.90 usec
P21         0.90 usec
P22         0.90 usec
P23         0.90 usec
P24         0.90 usec
P25         0.90 usec
P26         0.90 usec
P27         0.90 usec
P28         0.90 usec
P29         0.90 usec
P30         0.90 usec
P31         0.90 usec
P32         0.90 usec
P33         0.90 usec
P34         0.90 usec
P35         0.90 usec
P36         0.90 usec
P37         0.90 usec
P38         0.90 usec
P39         0.90 usec
P40         0.90 usec
P41         0.90 usec
P42         0.90 usec
P43         0.90 usec
P44         0.90 usec
P45         0.90 usec
P46         0.90 usec
P47         0.90 usec
P48         0.90 usec
P49         0.90 usec
P50         0.90 usec
P51         0.90 usec
P52         0.90 usec
P53         0.90 usec
P54         0.90 usec
P55         0.90 usec
P56         0.90 usec
P57         0.90 usec
P58         0.90 usec
P59         0.90 usec
P60         0.90 usec
P61         0.90 usec
P62         0.90 usec
P63         0.90 usec
P64         0.90 usec
P65         0.90 usec
P66         0.90 usec
P67         0.90 usec
P68         0.90 usec
P69         0.90 usec
P70         0.90 usec
P71         0.90 usec
P72         0.90 usec
P73         0.90 usec
P74         0.90 usec
P75         0.90 usec
P76         0.90 usec
P77         0.90 usec
P78         0.90 usec
P79         0.90 usec
P80         0.90 usec
P81         0.90 usec
P82         0.90 usec
P83         0.90 usec
P84         0.90 usec
P85         0.90 usec
P86         0.90 usec
P87         0.90 usec
P88         0.90 usec
P89         0.90 usec
P90         0.90 usec
P91         0.90 usec
P92         0.90 usec
P93         0.90 usec
P94         0.90 usec
P95         0.90 usec
P96         0.90 usec
P97         0.90 usec
P98         0.90 usec
P99         0.90 usec
P100        0.90 usec
SF01        500.1322596 MHz
SF02        500.1322596 MHz
SF03        500.1322596 MHz
SF04        500.1322596 MHz
SF05        500.1322596 MHz
SF06        500.1322596 MHz
SF07        500.1322596 MHz
SF08        500.1322596 MHz
SF09        500.1322596 MHz
SF10        500.1322596 MHz
SF11        500.1322596 MHz
SF12        500.1322596 MHz
SF13        500.1322596 MHz
SF14        500.1322596 MHz
SF15        500.1322596 MHz
SF16        500.1322596 MHz
SF17        500.1322596 MHz
SF18        500.1322596 MHz
SF19        500.1322596 MHz
SF20        500.1322596 MHz
SF21        500.1322596 MHz
SF22        500.1322596 MHz
SF23        500.1322596 MHz
SF24        500.1322596 MHz
SF25        500.1322596 MHz
SF26        500.1322596 MHz
SF27        500.1322596 MHz
SF28        500.1322596 MHz
SF29        500.1322596 MHz
SF30        500.1322596 MHz
SF31        500.1322596 MHz
SF32        500.1322596 MHz
SF33        500.1322596 MHz
SF34        500.1322596 MHz
SF35        500.1322596 MHz
SF36        500.1322596 MHz
SF37        500.1322596 MHz
SF38        500.1322596 MHz
SF39        500.1322596 MHz
SF40        500.1322596 MHz
SF41        500.1322596 MHz
SF42        500.1322596 MHz
SF43        500.1322596 MHz
SF44        500.1322596 MHz
SF45        500.1322596 MHz
SF46        500.1322596 MHz
SF47        500.1322596 MHz
SF48        500.1322596 MHz
SF49        500.1322596 MHz
SF50        500.1322596 MHz
SF51        500.1322596 MHz
SF52        500.1322596 MHz
SF53        500.1322596 MHz
SF54        500.1322596 MHz
SF55        500.1322596 MHz
SF56        500.1322596 MHz
SF57        500.1322596 MHz
SF58        500.1322596 MHz
SF59        500.1322596 MHz
SF60        500.1322596 MHz
SF61        500.1322596 MHz
SF62        500.1322596 MHz
SF63        500.1322596 MHz
SF64        500.1322596 MHz
SF65        500.1322596 MHz
SF66        500.1322596 MHz
SF67        500.1322596 MHz
SF68        500.1322596 MHz
SF69        500.1322596 MHz
SF70        500.1322596 MHz
SF71        500.1322596 MHz
SF72        500.1322596 MHz
SF73        500.1322596 MHz
SF74        500.1322596 MHz
SF75        500.1322596 MHz
SF76        500.1322596 MHz
SF77        500.1322596 MHz
SF78        500.1322596 MHz
SF79        500.1322596 MHz
SF80        500.1322596 MHz
SF81        500.1322596 MHz
SF82        500.1322596 MHz
SF83        500.1322596 MHz
SF84        500.1322596 MHz
SF85        500.1322596 MHz
SF86        500.1322596 MHz
SF87        500.1322596 MHz
SF88        500.1322596 MHz
SF89        500.1322596 MHz
SF90        500.1322596 MHz
SF91        500.1322596 MHz
SF92        500.1322596 MHz
SF93        500.1322596 MHz
SF94        500.1322596 MHz
SF95        500.1322596 MHz
SF96        500.1322596 MHz
SF97        500.1322596 MHz
SF98        500.1322596 MHz
SF99        500.1322596 MHz
SF100       500.1322596 MHz
----- Acquisition Parameters
NUC1         1H
NUC2         13C
TD           128
SFO1         500.1322596 MHz
SFO2         125.7603250 MHz
SFO3         23.4750600 MHz
SFO4         6.0980000 MHz
SFMODE       OF
----- Processing parameters
SI           2048
SF           500.1322596 MHz
WDW          COSINE
SSB          0
GB           0
PC           1.40
----- F1 - Processing parameters
SI           256
PC2          OF
SF           500.1322596 MHz
WDW          COSINE
SSB          2
GB           0
PC           0.90 Hz
----- F2 - Processing parameters
SI           2048
SF           500.1322596 MHz
WDW          COSINE
SSB          2
GB           0
PC           1.40
----- F3 - Processing parameters
SI           256
PC3          OF
SF           500.1322596 MHz
WDW          COSINE
SSB          2
GB           0
PC           0.90 Hz

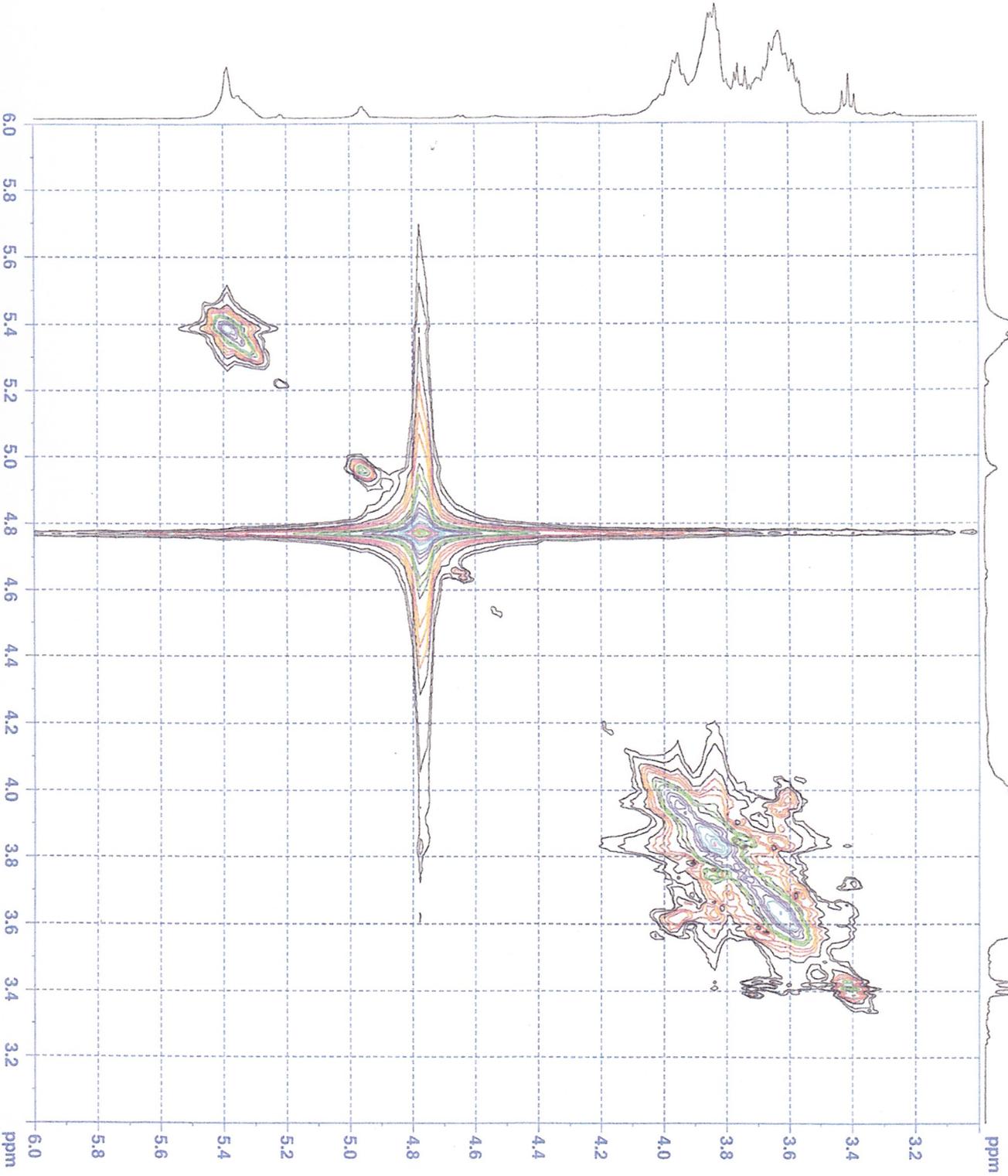
```







COSY



```

Current Data Parameters
NAME          funnel121
EXTRNO       12
PROCNO       1

F1 - Acquisition Parameters
Date_         20110928
Time_        14.15
INSTRUM      spect
PROBHD       5 mm CPDUI 13C
PULPROG      cosyprgf
TD           2948
SOLVENT      CDCl3
NS           4
DS           16
SWH          1004.899 Hz
AQ           1.460016 sec
RG           0.3440016 sec
FIDRES       45.3
AQRES        156.400 usec
DE           6.00 usec
TE           298.0 K
d0           0.00000300 sec
d1           2.00000000 sec
d13          0.00000400 sec
d16          0.00010000 sec
d19          0.00032000 sec
d20          0.00000000 sec
MORPH        2.00000000 sec
***** CHANNEL f1 *****
NUC1         1H
P0           14.00 usec
P1           14.00 usec
P21          -5.80 dB
SFO1         500.132506 MHz

***** GRADIENT CHANNEL *****
GAMMA1       1H
GPRM1        SINE 1.00
GPRM2        SINE 1.00
GPR3         0.00 %
GPR4         0.00 %
GPR5         0.00 %
GPR6         0.00 %
GPR7         0.00 %
GPR8         0.00 %
GPR9         0.00 %
GPR10        10.00 %
GPR11        10.00 %
GPR12        10.00 %
P16          1000.00 usec

F1 - Acquisition Parameters
NUC1         13C
SFO1         500.1313 MHz
PRDS        23.475660 Hz
SN           6.008 ppm
P1MODE       gp

F1 - Processing parameters
SI           2048
SF           500.1299666 MHz
WDW          QSHINE
SSB          2
LB           0.00 Hz
GB           0
PC           1.00

F1 - Processing parameters
SI           256
HC2         0P
SF           500.1299666 MHz
WDW          QSHINE
SSB          2
LB           0.00 Hz
GB           0
  
```

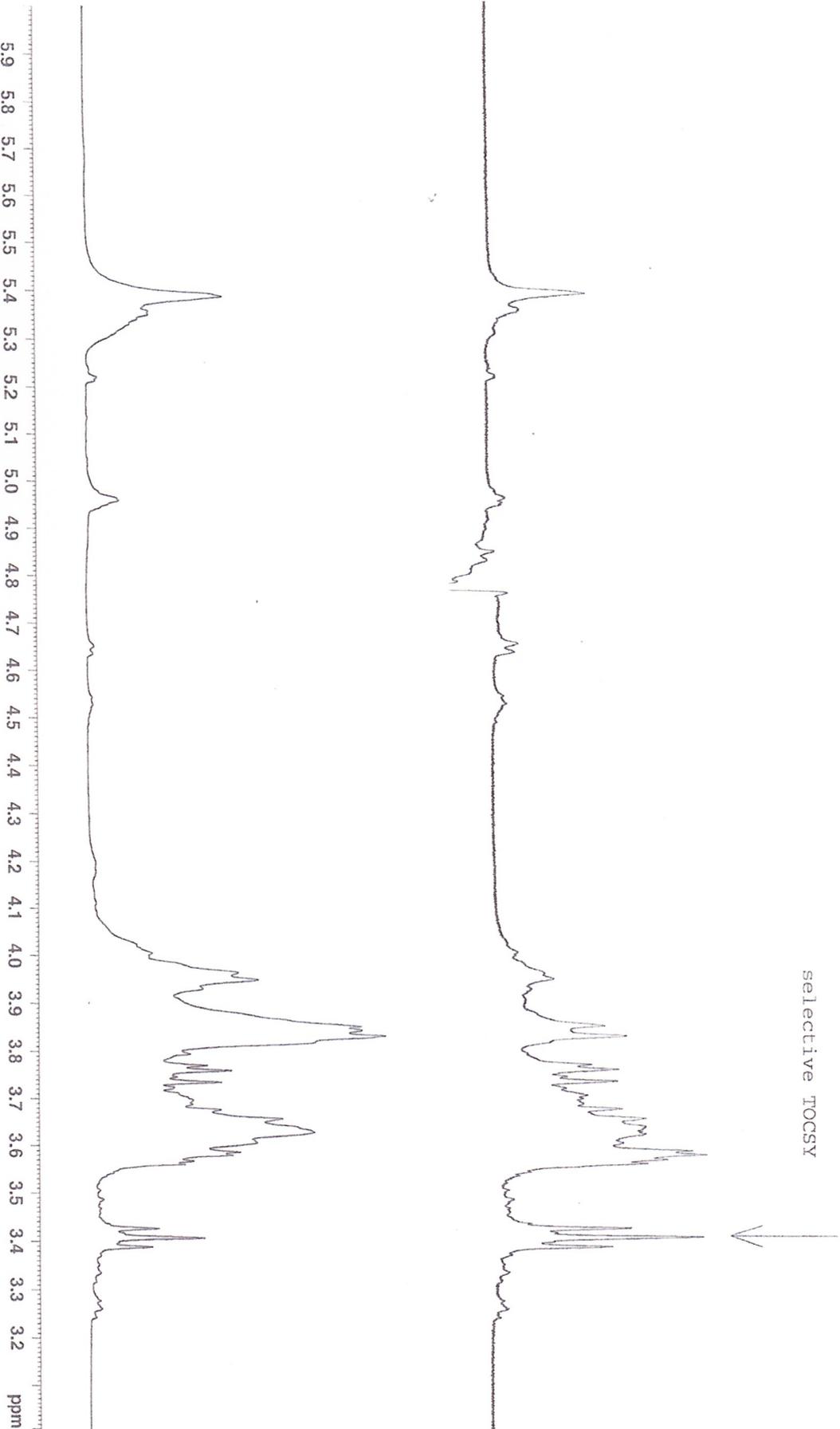


DDS P#5, 57mg/0.6mL, D2O, 298K, Bruker AVANCE500



<sup>1</sup>H

selective TOCSY



Current Data Parameters  
 NAME funnel21  
 EXPNO 1  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20120907  
 Time 16:29  
 INSTRUM spect  
 PROBRD 5 mm CRYOL 13C  
 PULPROG zgpg30  
 TD 65536  
 SOLVENT D2O  
 NS 15  
 DS 2  
 SWH 6009.615 Hz  
 FIDRES 0.091699 Hz  
 AQ 5.4527283 sec  
 RG 20.2  
 DM 83.200 usec  
 DE 6.00 usec  
 TE 298.2  
 D1 2.00000000 sec  
 d12 0.00002000 sec  
 MCHST 0.00000000 sec  
 MCWHK 0.01500000 sec

\*\*\*\*\* CHANNEL f1 \*\*\*\*\*  
 NU1 1  
 P1 15.00 usec  
 PL1 -5.80 dB  
 FL1 44.76 dB  
 SFO1 500.1324524 MHz

F2 - Processing Parameters  
 SI 55316 MHz  
 WDW EM  
 SSB 0  
 LB 0.00 Hz  
 GB 0  
 PC 1.00

## IV. 考察

本研究では当初、親株の *B. circulans* T-3040 株が持つ性質を踏まえて変異株である *B. circulans* G22-10 株がデンプンから CI を産生する酵素を生産する可能性が示唆されたことから、1949 年に Hehre が報告したデキストリンデキストラナーゼを想定して研究を始めた<sup>9)</sup>。デキストリンデキストラナーゼに関してはこれまでも 1990 年代に *Acetobacter capsulatum* において報告がある<sup>10-33)</sup>。*B. circulans* T-3040 株については、マルトオリゴ糖を不均化する活性を示す 135 kDa タンパク質および CITase の作用で SST から DX を生成することが明らかになったが<sup>17)</sup>、135 kDa タンパク質の生産量は非常に少なく、これが澱粉から CITase の基質と成り得るデキストランを生産するかどうかは確認されていない。*B. circulans* G22-10 変異株においても親株と同等の作用性を期待したが、基質 SST から DX を生成する酵素反応および CI を生成する活性は明確に検出できなかった。しかしながら、G22-10 株の培養上清に、SST, DX に対してともに同程度の加水分解活性を示す酵素活性を見出した。培養の炭素源による活性の強さの差異はあったものの、用いた基質の  $\alpha$ -1,4 型、 $\alpha$ -1,6 型ともに加水分解して還元糖を生成する活性が見出され、活性の強さの比率は基質の種類に関わらずほぼ 1:1 であった。この培養上清に  $\alpha$ -1,4 結合型基質の SST と  $\alpha$ -1,6 結合型基質の DX を長時間作用させ反応生成物を HPLC で分析したところ、基質の種類に関わらず HPLC のピーク形がよく似ていた。つまり  $\alpha$ -1,4 結合型、 $\alpha$ -1,6 結合型の基質とともに作用し、加水分解を受けた低分子のオリゴ糖を多数生成したことが明らかになった。

作用性の異なる多種類の酵素の混在の可能性があったため、本酵素を SephacrylS-200 によるゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより簡易精製して得られた活性画分を用いて酵素反応特性を分析した。その結果、基質に用いたマルトオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖に対して同程度の活性を有し、低分子のオリゴ糖を生成した。また、基質として用いたオリゴ糖よりも高分子のオリゴ糖が多数生成されていたことから本酵素が分子の再配列を行うことが示唆された。その際に、 $\alpha$ -1,4 結合型の基質から  $\alpha$ -1,6 結合型の生成物を生産し、またその逆反応も起こっていることから、本酵素はこれまでにない、新規の性質を持っている酵素である可能性が示唆された。

本酵素の精製法の確立のために様々なカラムクロマトグラフィーを試みたが、アフィニティーカラムクロマトグラフィーや疎水性カラムクロマトグラフィーでは、活性画分に多量の夾雑タンパク質も含まれ、目的とする酵素タンパク質の分離は難しかった。イオン交換カラムでの精製を試みたが、目的とする活性ピークと重なって多量の糖質が溶出されることが分かり、この糖が精製の障害となっていた。そこで、ホウ酸緩衝液が多糖と複合体を形成する性質を利用して本酵素と挙動を同じくする夾雑多糖との分離を試み、さらに唾液の  $\alpha$ -アミラーゼで前処理

した。その結果、これまでに分離が困難であった著量の多糖は活性ピークと分離したため、精製への影響が少なくなった。ここで得られた活性画分を SDS-PAGE に供したところ、52 kDa の位置に単一のタンパク質バンドが得られたことより、本酵素はアミラーゼとデキストラナーゼの性質を併せ持つ  $\alpha$ -グルカナーゼであると定義した。

本酵素は、精製の各段階においても比活性の上昇の割合や、活性収率の値に基質の種類による大きな差は見られなかった。 $\alpha$ -1,4 結合型の澱粉と、 $\alpha$ -1,6 結合型のデキストランに同程度に作用することは、酵素の持つ基質特異性の面から見ても、興味深い。このように 2 種の基質に対して同様に作用する酵素は、最近の報告では、澱粉に作用して  $\alpha$ -1,4 結合の他に  $\alpha$ -1,6 結合の直鎖と  $\alpha$ -1,3 結合で分岐したグルカンを生成する 2 種類の酵素の存在が報告されている<sup>30,32)</sup>。

反応生成物の HPLC 分析により、精製酵素との反応に用いたすべての基質から Glc, M2, M3 の 3 種類の糖が検出されたことから本酵素は  $\alpha$ -1,4 結合と  $\alpha$ -1,6 結合を加水分解するだけでなく、不均化反応 (disproportionation) を触媒することが示唆された。この反応は親株である *B. circulans* T-3040 にも見られるため、G22-10 変異株と親株は同様の作用性を持っていることが考えられる。環状オリゴ糖の CD, CI を分解することからエンド型の作用様式を持つことも分かった。また、基質として用いた原糖よりも重合度の大きいオリゴ糖も少量ながら生成していることが分かったが、単なる転移反応生成物である可能性も否定できないため、この点はさらに検討が必要である。以上の結果から、本酵素は基質として  $\alpha$ -1,4 結合型にも  $\alpha$ -1,6 結合型にも作用することが明らかとなったため、アミラーゼとデキストラナーゼの性質をあわせ持つ  $\alpha$ -グルカナーゼであることが確認された。本酵素は両結合の加水分解反応および不均化反応を触媒する酵素である可能性が高い。

単一酵素が 2 種の異なる基質に対して作用する例としては、古くからその作用が広く知られているグルコアミラーゼがある<sup>19)</sup>。この酵素は澱粉を分解して Glc を生成するが、 $\alpha$ -1,6 結合からなる DX にも緩やかに作用して Glc を生成する<sup>20)</sup>。この酵素はエキソ型の作用を示すことから、G22-10 変異株由来のエンド型の本酵素とは異なる分類になる。最近では、アルカリ性 *Bacillus* 由来のアミロプルラナーゼについての報告がされている<sup>21,46)</sup>。この酵素は単一のタンパク質であるが、ふたつの異なった活性中心を持ち、ひとつは澱粉の  $\alpha$ -1,4 結合を加水分解し、もうひとつはプルランの  $\alpha$ -1,6 結合を加水分解する。また、これとは別に澱粉と DX を共に分解する酵素として、耐熱性のバクテリアが、嫌気、高温培養時に最大活性を持つ耐熱性のアミロデキストラナーゼを生産することが報告されている。この酵素も  $\alpha$ -1,6 結合と  $\alpha$ -1,4 グルコシド結合に作用するが<sup>25)</sup>、その性質、糖転移反応性などに関する詳細は明らかではない<sup>26,27)</sup>。さらに、*Lipomyces starkeyi* KSM

22 の酵素では、アミラーゼ活性とデキストラナーゼ活性をもつ酵素が分子量 100 kDa の単一のタンパク質として精製され、それぞれの酵素活性について精製後の比活性と全活性の割合がほぼ等しいことが報告されている<sup>28)</sup>。この酵素は SST や DX の他に  $\alpha$ -1,3 結合を含む、う蝕性細菌の *Streptococcus mutans* が生産するムタンを SST, DX と同レベルの 90 % 近い加水分解率で分解することから、ブランクの除去に有効であると述べられている<sup>29)</sup>。

最近の研究で、親株の *B. circulans* T-3040 株が生産する酵素の中にも SST の  $\alpha$ -1,4 結合を加水分解する活性が存在することが報告された<sup>17)</sup>。この酵素は  $\alpha$ -1,4 グルコシド結合を分解して  $\alpha$ -1,6 結合を生成する活性を有し、CITase を共存させると CI を生成すると報告されている。G22-10 変異株は、親株の T-3040 が持つ  $\alpha$ -1,4 結合から  $\alpha$ -1,6 結合を作る性質が変異することにより、ひとつの酵素で異なる結合様式の基質に同等に作用する性質を得たのではないかと考えられる。しかし、この点を明らかにするためには、塩基配列など酵素タンパク質の構造に対する研究が必要であると考えられる。また、別の研究では *B. subtilis* host-vector system の CITase は分子量が 103 kDa であるが、CITase が限定分解を受けた後に生じるタンパク質断片の中で DX 分解活性を示したのは 88 kDa のタンパク質であった<sup>47)</sup>。G22-10 変異株の本酵素はこれよりも分子量が小さいことから、上記の 88 kDa の限定分解物とは別のタンパク質であることが推測される。

これとは別に、*Paenibacillus* 属菌株において、澱粉を基質として  $\alpha$ -1,6 結合の直鎖状の構造を含む多分岐グルカンが酵素合成されたとの報告がある<sup>30,32)</sup>。この多糖は 2 種類の酵素の協同作用によって生成される。すなわち、 $\alpha$ -アミラーゼが澱粉を分解し、これに  $\alpha$ -グルコシダーゼが働いて  $\alpha$ -1,6 結合および  $\alpha$ -1,3 結合が生成される反応機構が提出されている。この点で、われわれが見出した G22-10 変異株の酵素は SST と DX の 2 種の基質に作用して加水分解と糖転移の反応を触媒することから上記の *Paenibacillus* の酵素系と同じように多分岐グルカンの酵素合成に利用できる可能性を期待したい。まとめとして、*B. circulans* G22-10 変異株が生産する本酵素はアミラーゼ活性、デキストラナーゼ活性、および糖転移活性を持つ  $\alpha$ -グルカナーゼであることが明らかになった。これまでに文献に報告されている酵素<sup>23-25,28,29)</sup>と比較して、本酵素は加水分解反応と共に糖転移反応を行うエンド型酵素である点が大きな特徴と考えられる。今後の研究では反応生成物の化学構造の詳細な解析を通して本酵素の反応機構を明らかにすることを考えている。今後の我々の研究によりこの酵素の性質や転移反応の詳細が明らかになれば、新しい酵素としての位置づけが可能になると期待される。また、本酵素の高い転移能を利用してデンプン (SST) から食物繊維を作るなどの応用研究への発展が進められることを期待したい。

## V. 総括

*Bacillus circulans* T-3040 株は環状オリゴ糖のサイクロデキストラン生産菌として単離されたものであるが、その変異株として得られた G22-10 株が産生する酵素が興味深い性質を持つことを見出した。G22-10 株の培地の炭素源として  $\alpha$ -1,4 結合型基質である可溶性澱粉 (SST) および  $\alpha$ -1,6 結合型基質であるデキストラン (DX) を用いた培養で、生産された酵素は SST と DX に対して共に加水分解活性を示し、両活性の比率も炭素源にかかわらずほぼ同等であった。

この酵素を部分精製し、 $\alpha$ -1,4 結合型の重合度の異なるオリゴ糖(M2~M6)を基質として反応させた。A500 の結果から、基質を加水分解し還元糖を生成しており、HPLC 分析の結果からグルコースやマルトースなどのオリゴ糖が増加したことが分かった。また、基質として用いた原糖よりも重合度の大きいオリゴ糖も増加していたことから、分子の再配列を行っている可能性が示唆された。この反応は、M3 および M4 が顕著であった。また、環状オリゴ糖である CD および CI にも作用したことから、本酵素はエンド型の性質を持つことが明らかになった。

本酵素の精製法を検討する過程で、酵素の活性ピークと同じ位置に著量の糖が存在することが明らかになった。この夾雑多糖は、唾液  $\alpha$ -アミラーゼによって分解され、低分子化した。この前処理により、カラムクロマトグラフィによる酵素の分離、精製が可能になった。本酵素の精製には QAE-Toyopearl カラムを用いた。このカラムで得られた活性画分を Sephacryl S-200 カラムでさらに精製した。画分の活性測定で基質 SST, DX とともに同じ溶出位置に酵素活性のピークが得られた。

この活性画分を濃縮し、SDS-PAGE で分析したところ、単一のタンパク質バンドが得られ、以上の結果から、本酵素は 2 つの結合様式の異なる基質、SST, および DX に同等に作用できる単一タンパク質であることが示唆された。精製表より、精製純度が上がっても SST, DX それぞれの基質に対する比活性の比率はほぼ一定で変わらず、同等の割合で作用していることから、2 種の酵素が混在しているのではなく、単一の酵素が作用していると結論された。本酵素は SDS-PAGE 分析の検量線より分子量 52 kDa と測定された。

本酵素について酵素化学的性質の測定を行った。至適 pH は pH 7.5 付近であり、安定性は pH 6.5 から pH 7.5 の範囲で安定であった。最適作用温度は 30°C であり、温度安定性は 15°C から 30°C 付近までは 80 % 程度の活性を保持した。重金属・化学修飾試薬による阻害剤の影響については、基質 SST, 基質 DX 両方とも塩化カルシウムで賦活作用が見られた。これは親株と類似の性質であった。基質 SST は硫酸銅、塩化第一鉄で阻害され、基質 DX は EDTA

で最も阻害された。

この酵素を用いて基質特異性を検討した。 $\alpha$ -1,4 結合型および $\alpha$ -1,6 結合型の種々の基質と反応させ、その作用性を比較した。 $\alpha$ -1,4 結合型の多糖では還元力を生成する強い活性が見られたが、オリゴ糖の FG67 では若干活性が弱かった。 $\alpha$ -1,6 結合型の基質では DX の重合度が 10 k および 500 k のもので強い還元力を示した。

本酵素は SST, DX ほかの $\alpha$ -1,4 結合と $\alpha$ -1,6 結合をもつ基質に作用して、グルコースやマルトース、イソマルトースを生成した。また、本酵素は環状オリゴ糖の CD と CI を分解することからエンド型の分解活性を持つことがわかった。また、HPLC の結果から、糖転移反応により原糖以上の分子量のオリゴ糖が合成されている可能性が示唆された。

基質として FG67 を用いたときの(P.95~96)本酵素による反応生成物はゲルろ過により分子量約 2 万であることが分かった。酵素分解したところ $\alpha$ -アミラーゼでもデキストラナーゼでも分解を受け、オリゴ糖を生成したことから $\alpha$ -1,4 結合と $\alpha$ -1,6 結合の混在する形ではないかと推定された。反応生成物の HPLC 分析では基質の種類に関わらず同じ溶出時間のところに似た形をもつ複数のピークが検出されたことから、 $\alpha$ -1,4 結合型の基質からも $\alpha$ -1,6 結合型の基質からも、生成される物質は同じ組成である可能性が示唆された。

FG67 由来の反応生成物の NMR 分析の結果、反応生成物の構造は 2 次元 NMR の結果からこの酵素は $\alpha$ -1,4 結合している基質に作用して、 $\alpha$ -1,6 結合の分岐が生成していることが分かった。

以上の結果から、本酵素は $\alpha$ -1,4 結合型と $\alpha$ -1,6 結合型の両基質に作用するアミラーゼとデキストラナーゼの作用（特異性）をあわせ持つ $\alpha$ -グルカナーゼであることが明らかとなった。

## VI. 文献

- 1) 中村道徳, 貝沼圭二編 : 生化学実験法 25. 「澱粉・関連糖質酵素実験法」, 瓜谷郁三, 駒野徹, 志村憲助, 中村道徳, 船津勝編集, 学会出版センター, 東京, pp.213-220 (1989).
- 2) T. Oguma, T. Horiuchi and M. Kobayashi: Novel cyclic dextrans, cycloisomaltooligosaccharides, from *Bacillus* sp. T-3040 culture. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **57**, 1225-1227 (1993).
- 3) T. Oguma, K. Tobe and M. Kobayashi: Purification and properties of a novel enzyme from *Bacillus* spp. T-3040, which catalyzes the conversion of dextran to cyclic isomaltooligosaccharides. *FEBS Lett.*, **345**, 135-138 (1994).
- 4) M. Kobayashi, K. Funane and T. Oguma: Inhibition of dextran and mutan synthesis by cycloisomaltooligosaccharides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 1861-1865 (1995).
- 5) C. Y. Jin, D. D. Zhang, T. Oguma and S. X. Qian: Studies on novel cyclodextrans: inclusion of C60 and C70. *J. Incl. Phenom. Mol. Recognit. Chem.*, **24**, 301-310 (1996).
- 6) Y.M.Kim, E.Yamamoto, M.Kang, H.Nakai, W.Saburi, M.Okuyama, H.Mori, K.Funane, M.Momma, Z.Fujimoto, M.Kobayashi, D.Kim, A.Kimura : *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 glycoside hydrolase family 66 homolog catalyzes dextranolytic and cyclization reactions. *FEBS Journal.*, **279**, 3185–3191(2012).
- 7) 中村道徳, 貝沼圭二編 : 生化学実験法 25. 「澱粉・関連糖質酵素実験法」, 瓜谷郁三, 駒野徹, 志村憲助, 中村道徳, 船津勝編集, 学会出版センター, 東京, pp.303-311(1989).
- 8) Y.M.Kim, Y.Kiso, T.Muraki, M.S.Kang, H.Nakai, W.Saburi, W.Lang, H.K.Kang, M.Okuyama, H.Mori, R.Suzuki, K.Funane, N.Suzuki, M.Momma, Z.Fujimoto, T.Oguma, M.Kobayashi, D.Kim, A.Kimura : Novel dextranase catalyzing cycloisomaltooligosaccharide formation and identification of catalytic amino acids and their functions using chemical rescue approach. *J. Biol. Chem.*, **287**, 19927–19935(2012).
- 9) E. J. Hehre and D. M. Hamilton: Bacterial conversion of dextrin into a polysaccharide with the serological properties of dextran. *Exp. Biol. Med.*, **71**, 336-339 (1949).
- 10) M. Suzuki, T. Unno and G. Okada: Simple purification and characterization of an extracellular dextrin dextranase from *Acetobacter capsulatum* ATCC 11894. *J. Appl. Glycosci.*, **46**, 469-473 (1999).
- 11) K. Yamamoto, K. Yoshikawa, S. Kitahata and S. Okada: Purification and some

- properties of dextrin dextranase from *Acetobacter capsulatus* ATCC 11894. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 169-173 (1992).
- 12) K. Yamamoto, K. Yoshikawa and S. Okada: Structure of dextran synthesized ATCC 11894 by dextrindextranase from *Acetobacter capsulatus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **57**, 1450-1453 (1993).
- 13) K. Yamamoto, K. Yoshikawa and S. Okada: Substrate specificity of dextrin dextranase from *Acetobacter capsulatus* ATCC 11894. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 330-333 (1994).
- 14) N. Suzuki, Z. Fujimoto, Y. M. Kim, M. Momma, N. Kishine, R. Suzuki, S. Suzuki, S. Kitamura, M. Kobayashi, A. Kimura and K. Funane: Structural elucidation of the cyclization mechanism of  $\alpha$ -1,6-glucan by *Bacillus circulans* T-3040 cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase. *J. Biol. Chem.*, **289**, 12040-12051 (2014).
- 15) T.Oguma, S.Kitao, M.Kobayashi : Pulifocation and characterization of cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase and cloning of cit from *Bacillus circulans* U-155. *J.Appl.Glycosci.*, **61**, 93-97(2014).
- 16) K. Funane, Y. Kawabata, R. Suzuki, Y. M. Kim, H. K. Kang, N. Suzuki, Z. Fujimoto, A. Kimura, M. Kobayashi: Deletion analysis of regions at the C-terminal part of cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase from *Bacillus circulans* T-3040. *Biochim Biophys Acta*, **1814**, 428–434 (2011).
- 17) K. Funane, H. Ichinose, M. Araki, R. Suzuki, K. Kimura, Z. Fujimoto, M. Kobayashi and A. Kimura: Evidence for cycloisomaltooligosaccharide production from starch by *Bacillus circulans* T-3040. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 3947-3954 (2014).
- 18) R.Suzuki, K.Terasawa, K.Kimura, Z.Fujimoto, M.Momma, M.Kobayashi, A.Kimura, K.Funane : Biochemical characterization of a novel cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase from *Paenibacillus* sp.598K. *Biochim Biophys Acta*, **1824**, 919–924 (2012).
- 19) 中村道徳，貝沼圭二編：生化学実験法 25.「澱粉・関連糖質酵素実験法」，瓜谷郁三，駒野 徹，志村憲助，中村道徳，船津 勝編集，学会出版センター，東京，pp.164- 173 (1989).
- 20) M. Kobayashi and K. Matsuda: Action of the glucoamylase on dextrans as an exo-dextranase. *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 181-183 (1978).
- 21) Y. Hatada, K. Igarashi, K. Ozaki, K. Ara, J. Hitomi, T. Kobayashi, S. Kawai, T. Watabe and S. Ito: Amino acid sequence and molecular structure of an alkaline

- amylopullulanase from *Bacillus* that hydrolyzes  $\alpha$ -1,4 and  $\alpha$ -1,6 linkages in polysaccharides at different active sites. *J. Biol. Chem.*, **271**, 24075-24083 (1996).
- 22) K. Ara, K. Saeki, K. Igarashi, M. Takaiwa, T. Uemura, H. Hagihara, S. Kawai, S. Ito: Purification and characterization of an alkaline amylopullulanase with both alpha-1,4 and alpha-1,6 hydrolytic activity from alkalophilic *Bacillus* sp. KSM-1378. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1243**(3), 315-324 (1995).
- 23) J. H. Kim, M. Sunako, H. Ono, Y. Murooka, E. Fukusaki and M. Yamashita: Characterization of gene encoding amylopullulanase from plant-originated lactic acid bacterium, *Lactobacillus plantarum* L137. *J. Biosci. Bioeng.*, **106**, 449-459 (2008).
- 24) J. H. Kim, M. Sunako, H. Ono, Y. Murooka, E. Fukusaki and M. Yamashita: Characterization of the C-terminal truncated form of amylopullulanase from *Lactobacillus plantarum* L137. *J. Biosci. Bioeng.*, **107**, 124-129 (2009).12) H. Watanabe, T. Nishimoto, T. Yamamoto, M. Kubota, H. Chaen, S. Fukuda and K. Tsusaki: Structure of a novel highly branched  $\alpha$ -glucan enzymatically produced from maltodextrin. *Carbohydr. Res.*, **344**, 2151-2156 (2009).
- 25) C. Wynter: Screening method for dextranase and amyloextranases from anaerobic thermophiles. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **42**, 213-223 (1996).
- 26) C. V. A. Wynter, M. Chang, J. Jersey, B. Patel, P. A. Inkerman and S. Hamilton: Isolation and characterization of a thermostable dextranase. *Enzyme Microb. Technol.*, **20**, 242-247 (1997).
- 27) C. Wynter: Partial purification of a thermostable dextranase using Sephacryl S-300 adsorption. *Lett. Appl. Microbiol.*, **25**, 321-324 (1997).
- 28) S. J. Ryu, D. Kim, H. J. Ryu, S. Chiba, A. Kimura and D. F. Day: Purification and partial characterization of a novel glucanhydrolase from *Lipomyces starkeyi* KSM 22 and its use for inhibition of insoluble glucan formation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 223-228 (2000).
- 29) D. Kim, S. J. Ryu, E. J. Son, H. J. Chung and S. H. Kim: Glucanhydrolase from *Lipomyces starkeyi* KSM 22 as potential mouthwash ingredient. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **12**, 993-997 (2002).
- 30) H. Watanabe, T. Nishimoto, T. Yamamoto, M. Kubota, H. Chaen, S. Fukuda and K. Tsusaki: Structure of a novel highly branched  $\alpha$ -glucan enzymatically produced from maltodextrin. *Carbohydr. Res.*, **344**, 2151-2156 (2009).
- 31) H. Watanabe, K. Tsusaki, T. Yamamoto, T. Nishimoto, M. Kubota, H. Chaen, S. Fukuda : A novel highly branched  $\alpha$ -glucan enzymatically produced from

- maltodextrin. *J. Appl. Glycosci.*, **57**, Suppl., 39 (2010).
- 32) K. Tsusaki, H. Watanabe, T. Yamamoto, T. Nishimoto, H. Chaen and S. Fukuda: Purification and characterization of highly branched  $\alpha$ -glucan-producing enzymes from *Paenibacillus* sp. PP710. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 721-731 (2012).
- 33) 川端康之, 北尾 悟, 舟根和美, 渡嘉敷唯章, 儀部茂八, 宮城貞夫: ニトロソグアニジン変異およびストレプトマイシン耐性変異による環状イソマルトオリゴ糖合成酵素(CITase)生産菌 *Bacillus circulans* の育種. *食品・臨床栄養*, **1**, 43-48 (2006).
- 34) M. Somogyi: Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.*, **195**, 19-23 (1952).
- 35) M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350-356 (1956).
- 36) M. M. Bradford: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976).
- 37) B. D. Davis: Disc electrophoresis. II. method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404-427 (1964).
- 38) U. K. Laemmli: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-686 (1970).
- 39) G.S Walpale : *J. chem.Soc.*, **105**, 2501(1914).
- 40) 波多野智子 : 平成 18 年度卒業論文 果実の糖質分解酵素の関する研究, 実践女子大学食品化学研究室, p17(2006).
- 41) T.C.McIlvaine : *J.Biol.Chem.*, **49**, 183(1921).
- 42) S.P.L.Srensen : *Biochem.Z.*, **21**, 131(1909), **22**, 352(1909).
- 43) 中村道徳, 貝沼圭二編: 生化学実験法 25. 「澱粉・関連糖質酵素実験法」, 瓜谷郁三, 駒野 徹, 志村憲助, 中村道徳, 船津 勝編集, 学会出版センター, 東京, pp.204-208(1989).
- 44) 中村道徳, 貝沼圭二編: 生化学実験法 25. 「澱粉・関連糖質酵素実験法」, 瓜谷郁三, 駒野 徹, 志村憲助, 中村道徳, 船津 勝編集, 学会出版センター, 東京, pp.208-213(1989).
- 45) J. G. Dawber and S. I. E. Green: An11B nuclear magnetic resonance study of the reaction of the tetrahydroxyborate ion with polyhydroxy compounds. *J. Chem. Soc.*, **82**, 3407-3413 (1986).
- 46) 長瀬産業株式会社 ナガセ生化学工業株式会社, 橘 佳永, 倉村昭子, 白坂直輝, 鈴木裕治, 卯津羅健作, 小島岩夫: 超耐熱耐酸性アミロプルラーゼ,

特開平 11-318441, 1999-11-24.

- 47) Y. Kawabata, K. Kimura and K. Funane: Extracellular production of cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase and cyclodextran by a protease-deficient *Bacillus subtilis* host-vector system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **93**, 1877-1884 (2012).

## VII. 謝辭

本研究に使用した *Bacillus circulans* T-3040 の G22-10 変異株をご提供くださり、さらにご指導、ご助言を賜りました国立研究開発法人 農業・食品総合産業技術総合研究機構 食品総合研究所（茨城県）の舟根和美博士、実験に使用したグルコデキストラナーゼをご提供くださいました北海道大学大学院(北海道)木村淳夫教授, NMR 分析ならびにご指導をいただきました国立研究開発法人 農業・食品総合産業技術総合研究機構 食品総合研究所 小野裕嗣博士、に厚く御礼申し上げます。

また、実験に使用したデンプン、デキストラン、フジオリゴ G67、環状オリゴ糖およびアミラーゼ、デキストラナーゼ等をご提供くださいました、野田産業科学研究所（千葉県）小熊哲哉博士、天野エンザイム株式会社（愛知県）、塩水港精糖株式会社（東京都）、日本食品化工株式会社（東京都）をはじめ、関係の皆様深く感謝いたします。

また、本研究を進めるにあたり、終始懇切なるご指導を賜りました本学 食品化学研究室 小林幹彦教授、ならびに助手の延永真実さん、庄司紗都美さんに深くお礼申し上げます。

ありがとうございました。