二糖類加リン酸分解酵素に関する研究

北 岡 本 光

①

二糖類加リン酸分解酵素に関する研究

北岡　本光

目次

第Ⅰ章．序論 1

Ⅰ－1．はじめに 1
Ⅰ－2．二糖類加リン酸分解酵素について 2
Ⅰ－3．二糖類加リン酸分解酵素の性質に関するこれまでの研究 5
Ⅰ－4．二糖類加リン酸分解酵素の利用に関するこれまでの研究 10
Ⅰ－5．本研究の展望 12

第Ⅱ章．二糖類加リン酸分解酵素の精製と諸性質 14

Ⅱ－1．セロビオースホスホリラーゼの諸性質に関する研究 14

Ⅱ-1-1.序 14
Ⅱ-1-2.方法 15
Ⅱ-1-3.結果 25
Ⅱ-1-4.考察 47

Ⅱ－2．ラミナリビオースホスホリラーゼの諸性質に関する研究 51

Ⅱ-2-1.序 51
Ⅱ-2-2.方法 53
Ⅱ-2-3.結果 56
Ⅱ-2-4.考察 70

Ⅱ－3．二糖類加リン酸分解酵素の精製と諸性質に関する考察 72

Ⅱ－4．要約 78

第Ⅲ章．二糖類加リン酸分解酵素の利用に関する研究 80

Ⅲ－1．固定化セロビオースホスホリラーゼを用いたglucosyl-xyloseの合成 80

Ⅲ-1-1.序 80
Ⅲ-1-2.方法 81
Ⅲ-1-3.結果 82
Ⅲ-1-4.考察 92

Ⅲ－2．スクロースのみを原料としたセロビオースの合成 95

Ⅲ-2-1.序 95
Ⅲ-2-2.方法 97
Ⅲ-2-3.結果 98
Ⅲ-2-4.考察 98

Ⅲ－3．スクロースのみを原料としたラミナリビオースの合成 101
Ⅲ-3-1.序 101
Ⅲ-3-2.方法 103
Ⅲ-3-3.結果 103
Ⅲ-3-4.考察 107

Ⅲ－4．ラミナリオリゴ糖の合成 108
Ⅲ-4-1.序 108
Ⅲ-4-2.方法 109
Ⅲ-4-3.結果 110
Ⅲ-4-4.考察 113

Ⅲ－5．二糖類加リン酸分解酵素反応生成物を利用した、キシラナーゼの基質特異性の解析 115
Ⅲ-5-1．序 115
Ⅲ-5-2．方法 116
Ⅲ-5-3．結果 117
Ⅲ-5-4．考察 120

Ⅲ－6．要約 125

Ⅳ．結論 127

文献 130

謝辞 141

Figures

Fig. 1-1. Mechanism pf enzymatic reaction with two substrates and two products. 4

Fig. 2-1. Native PAGE of the cellobiose phosphorylase. 26

Fig. 2-2. Calibration of the molecular mass of the cellobiose phosphorylase by the gel filtration method. 27

Fig. 2-3. Calibration of the molecular mass of the cellobiose phosphorylase by SDS-PAGE. 28

Fig. 2-4. Autoradiogram of the D-[*U*-^{14}C]glucose exchange reaction. 30

Fig. 2-5. The 1/*v*-1/[cellobiose] plot on the phosphorolysis. 32

Fig. 2-6. Inhibition patterns of the products against the substrates. 33

Fig. 2-7. Time course of the reactions with the substrates of both anomeric configuration. 36

Fig. 2-8. Structure of pseudo-sugars. 38

Fig. 2-9. The double reciprocal plot between the initial velocity and the initial consentration of 5a-carba-β-DL-or D-glucopyranose. 39

Fig. 2-10. The *v*-[S] plots of the various glucosyl acceptors. 41

Fig. 2-11. The *v*-[Glc] plot at various [G-1-P]. 42

Fid. 2-12. The 1/*v*-1/[G-1-P] plot at various [Glc]. 43

Fig. 2-13. The K_m*app*- and V_{max}*app*-[Glc] plots. 44

Fig. 2-14. A proposed model of competitive substrate inhibition. 46

Fig. 2-15. Paramylon utilizing enzymes in *Euglena gracilis*. 52

Fig. 2-16. The first hydrophobic chromatogram on the purification of laminaribiose phosphorylase. 57

Fig. 2-17. The first anion exchange chromatogram on the purification of laminaribiose phosphorylase. 58

Fig. 2-18. Native-PAGE of the purified laminaribiose phosphorylases. 60

Fig. 2-19. Ouchterlony's double diffusion test on F0, F1, F2. 62

Fig. 2-20. Western blot assay on the three strains of *E. gracilis*. 64

Fig. 2-21. The 1/v-1/[laminaribiose] plot on the 67

Fig. 2-22. The v-[Glc] plot on the synthetic reaction of laminaribiose phosphorylase. 69

Fig. 2-23. Proposed mechanisms of the anomeric retention. 74

Fig. 2-24. Proposed mechanism of the anomeric inversion. 75

Fig.3-1. Paper chromatogram of the products of the reaction. 83

Fig. 3-2. Time course of GX formation. 85

Fig. 3-3. Hydrolysis of GX. 87

Fig. 3-4. FAB-MASS spectrum of GX. 88

Fig. 3-5. ^{1}H-^{1}H COSY spectrum of acatylated GX. 89

Fig. 3-6. Designation of protons of acetylated GX. 90

Fig. 3-7. Time course of the enzymatic synthesis of cellobiose. 99

Fig. 3-8. Time course of the enzymatic synthesis of laminaribiose. 105

Fig. 3-9. A ^{13}C-NMR spectrum on the laminaribiose synthesized in the reaction. 106

Fig. 3-10. Time course of the concentration of G-1-P. 111

Fig. 3-11. Concentration of laminarioligosaccharides after 48 hr incubation. 112

Fig. 3-12. A supposed subsite model of xylanase. 122

Tables.

Table 1-1. Phosphorolytic enzymes 2

Table 1-2. Disaccharide phosphorylases 5

Table 2-1. Summary of the purification of the cellobiose phosphorylase 25

Table 2-2. Substrate specificity for the glucosyl acceptor of the cellobiose phosphorylase 34

Table 2-3. Apparent kinetic parameters toward various substrates of the cellobiose phosphorylase. 35

Table 2-4. Assingments of chemical shifts on a ^{13}C-NMR spectrum of the pseudo-disaccharide formed. 40

Table 2-5. Summary of the purification of the laminaribiose phosphorylase 56

Table 2-6. Basic properties of the three purified laminaribiose phosphorylase 61

Table 2-7. Initial rates on phosphorolysis of laminarioligosaccharides . 63

Table 2-8. Substrate specificity for the glucosyl acceptor of the laminaribiose phosphorylase 65

Table 2-9. Inhibition pattern of the product of laminaribiose phosphorylase 68

Table 2-10. Disaccharide phosphorylases 72

Table 3-1. Activity of cellobiose phosphorylase and phosphogluco mutase of the acetone-treated cells before and after the treatment with 50% ethanol 84

Table 3-2. Chemical shifts and coupling constants in the ^{1}H-NMR spectrum of peracetylated GX 91

Table 3-3. Assignments of chemical shifts on a ^{13}C-NMR spectrum of GX 91

Table 3-4. Properties of GX compared with cellobiose and xylobiose 93

Table 3-5. Composition of laminariorigosaccharides formed 113

Table 3-6. List of xylanases used in this study 116

Table 3-7. Kinetic parameters of XCEL toward various substrates 118

Table 3-8. Activity toward 1mM G_2-pNP of various xylanases 119

Table 3-9. Kinetic parameters of the four xylanases toward xylan and the three *p*-nitrophenyl-glycosides 120

略号

活性Ⅰ： α－グルコース－1－リン酸とグルコースからラミナリビオースを生成する活性

活性Ⅱ： α－グルコース－1－リン酸とラミナリビオースからラミナリトリオースを生成する活性

緩衝液A： 50 mM リン酸緩衝液(pH 7.0)

緩衝液B： 50 mM トリス－塩酸緩衝液(pH 7.0)

緩衝液C： 10 mM トリス－塩酸緩衝液(pH 7.2)

緩衝液D： 50 mM トリス－塩酸緩衝液(pH 7.2)

緩衝液E： 100 mM トリス－塩酸緩衝液(pH 7.0)

緩衝液F： 50 mM イミダゾール－塩酸緩衝液(pH 7.0)

GX： 4-*O*-β-D-glucopyranosyl-D-xylose

XCEL： *Cellvibrio gilvus*キシラナーゼ

XSTR： *Streptomyces olivaceoviridis* E-86キシラナーゼ

XASP： *Aspergillus japonicus*キシラナーゼ

XROB： *Robillarda* sp. Y-20キシラナーゼ

G_2-pNP： *p*-nitrophenyl-β-D-cellobiopyranoside

GX-pNP： *p*-nitrophenyl-4-*O*-β-D-glucopyranosyl-β-D-xylopyranoside

X_2-pNP： *p*-nitrophenyl-β-D-xylobiopyranoside

Ⅰ－1．はじめに

近年，糖質の重要性がとみに注目されている。糖質関連酵素はこれら糖質の合成，変換，分解などに関わり、糖質の研究あるいは生産など基礎的および応用的に重要な役割を果たしている。グリコシル結合の消長に関する酵素は糖質関連酵素の中でも重要な位置を占めるものである。これらの酵素の中で、最も重要なものとして加水分解酵素が挙げられる。加水分解酵素は、アミラーゼによる澱粉糖化などを中心にして工業的に広く応用されている[1]。それにともない加水分解酵素に対して多くの基礎的および応用的研究がなされてきた[1,2]。加水分解酵素と同じ範疇の酵素として加リン酸分解酵素がある。加リン酸分解酵素は加水分解酵素と比較してⅠ－2に述べるように酵素反応解析に当たって有利な性質があると考えられる。しかしながら、加リン酸分解酵素の中にもホスホリラーゼのように多くの基礎的研究が行われている酵素もあるが，加水分解酵素と比較するとその研究例は少ない。

最近、オリゴ糖の生理機能が注目されるようになり、数種のオリゴ糖が工業的に製造されるようになった[3]。オリゴ糖の製造にはグリコシル結合の消長に関与する酵素の利用が重要であり、これらの酵素の新たな応用面として注目されている。現在工業的に生産されているオリゴ糖は加水分解酵素あるいは転移酵素を用いて製造されている。加リン酸分解酵素はⅠ－4で述べるようにオリゴ糖合成に有用な酵素であると考えられるが、現状では工業的には使用されているものはない。

以上のような状況の中で二糖類加リン酸分解酵素に関する本研究に着手した。二糖類加リン酸分解酵素は加リン酸分解酵素のうち二糖類を基質とする酵素群である。以下に二糖類加リン酸分解酵素の性質，研究例などについて詳しく述べるとともに、本研究の目的について記述する。

I－2．二糖類加リン酸分解酵素について

糖類のグリコシル結合を加リン酸分解する酵素は、Table 1-1に示したように9種類が知られている[4]。これらの酵素は国際生化学連合酵素委員会報告[5]により六炭糖を転移する酵素に分類され、EC 2.4.1.台の番号が与えられている。これらの9つの酵素はすべて切断される糖の非還元末端のグルコシル結合のみを切断する。すなわち基質の非還元末端残基はすべてグルコースである。これらの酵素は、以下に示すように切断される糖類の非還元末端のグルコシル結合を加リン酸分解してα－あるいはβ－型のグルコース－1－リン酸とアクセプター分子に分解する可逆反応を触媒する。

glucosyl-acceptor + Pi ⇌ glucose-1-phosphate + acceptor (1-1)

Table 1-1. Phosphorolytic enzymes.

EC. No.	Name	glucose-1-phosphate	substrate
2.4.1.1	phosphorylase	α	poly
2.4.1.7	sucrose phosphorylase	α	di
2.4.1.8	maltose phosphorylase	β	di
2.4.1.20	cellobiose phosphorylase	α	di
2.4.1.30	β-1,3-oligoglucan phosphorylase	α	oligo
2.4.1.31	laminaribiose phosphorylase	α	di
2.4.1.49	cellodextrin phosphorylase	α	oligo
2.4.1.64	trehalose phosphorylase	β	di
2.4.1.97	β-1,3-glucan phosphorylase	α	poly

di, disaccharide; oligo, oligosaccharide; poly, polysaccharide.

グリコシル結合を切断する酵素としては加水分解酵素がよく知られている。加水分解酵素はEC 3.2.1.台の番号が与えられている酵素群[4,5]であり、さまざまなグリコシル結合に作用するものが知られている。加水分解酵素では加リン酸分解酵素と異なり反応は見かけ上ほとんど不可逆的に進行する。この理由を説明するためにスクロース分解酵素であるα－グルコシダーゼとスクロースホスホリラーゼについて比較を行う。それぞれの酵素の反応式はそれぞれ(1-2)，(1-3)のよう

に表現される。

$$\text{sucrose} + H_2O \rightarrow \text{glucose} + \text{fructose} \quad (1\text{-}2)$$

$$\text{sucrose} + \text{Pi} = \text{glucose-1-phosphate} + \text{fructose} \quad (1\text{-}3)$$

酵素反応は通常水溶液中で行われるので、反応が通常の条件で行われるならば、反応液中のH_2O濃度は55 M程度となる。糖質分解反応の場合基質濃度は高くても2 M程度以下であるので、加水分解酵素の反応においてもH_2O濃度は反応前後でほとんど変化しない。そのため(1-2)式は常に左辺のH_2O水が過剰に存在する条件であるので、平衡はほとんど右に片寄るものと考えられる。加リン酸分解酵素の場合は(1-3)式の両辺ともにH_2Oを含まないため、加水分解酵素のような見かけ上の不可逆性は起こらない。反応の可逆性は逆反応を利用したグルコシドの合成の可能性を示唆する。さらに、加水分解酵素は本質的には二基質反応酵素ではあるが、左辺のH_2O濃度を制御することが不可能であるために一基質反応としてしかとらえることができない。加リン酸分解反応においてはリン酸濃度は自由に制御することが可能であるので二基質反応としてとらえることが可能である。このことにより加リン酸分解酵素はCleland[6]の提唱した反応機構(Fig. 1-1)を容易に調べることができる。

現在まで知られている加リン酸分解酵素による反応はすべて可逆的であるが、これらの酵素のほとんどが生体内では分解反応に寄与しているものと考えられる。最初に発見されたα-1,4-グルカンの加リン酸分解酵素[7]はホスホリラーゼと命名された。以降に発見された加リン酸分解酵素は例えばスクロースホスホリラーゼのように基質名の後にホスホリラーゼをつけて命名されている。

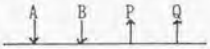
加リン酸分解酵素のうち、スクロースホスホリラーゼ，マルトースホスホリラーゼ，セロビオースホスホリラーゼ，ラミナリビオースホスホリラーゼ，トレハロースホスホリラーゼの5種の酵素が二糖類を加リン酸分解する。そのほかの4つの酵素は多糖あるいはオリゴ糖を分解する。多糖あるいはオリゴ糖を加リン酸分解する酵素においては反応生成物も分解反応の基質となる。すなわち(1-1)式におけるacceptorはなおglucosyl-acceptorで有り得る。そのために反応解析を行うに当たって結果の解釈が難しいことがある。それと比較して二糖類加リン酸分解酵素の場合には通常反応生成物は分解反応の基質とはならないのでその問題点は少ない。二糖類加リン酸分解酵素は逆反応においてアクセプターの基質特異性が

$$A + B \rightleftharpoons P + Q$$

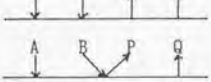
1. Sequential

$$v = \frac{Vmax[A][B]}{KiaKmb+Kmb[A]+Kma[B]+[A][B]}$$

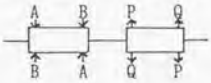
1-a. Ordered



1-b. Theorell-Chance



1-c. Random



2. Ping Pong

$$v = \frac{Vmax[A][B]}{Kmb[A]+Kma[B]+[A][B]}$$

Fig. 1-1. Mechanism of enzymatic reaction with two substrates and two products.

必ずしも厳密ではないことが知られている。本酵素の応用面としてこの性質を利用したヘテロ二糖の合成が考えられている。詳しい内容については I − 2 に記述する。

I − 3. 二糖類加リン酸分解酵素の性質に関するこれまでの研究

二糖類加リン酸分解酵素にはTable 1-2に示した5種のものが知られている。

Table 1-2. Disaccharide phosphorylases

name	configuration	acceptor exchange[a)]
sucrose phosphorylase	retention (α → α)	yes
maltose phosphorylase	inversion (α → β)	no
cellobiose phosphorylase	inversion (β → α)	unknown
laminaribiose phosphorylase	inversion (β → α)	no
trehalose phosphorylase	inversion (α → β)	unknown

[a)] in the absence of Pi.

スクロースホスホリラーゼ[EC 2.4.1.7]はこれら5種類の二糖類加リン酸分解酵素のうち最もよく研究されている酵素である。本酵素は(1-4)式に示したスクロースを可逆的に加リン酸分解して、α−グルコース−1−リン酸とフルクトースを生じる可逆反応を触媒する。他の二糖類加リン酸分解酵素はすべてグルコース二分子からなる二糖の分解酵素であるが、スクロースホスホリラーゼのみヘテロ二糖を分解する酵素である。

$$\text{sucrose} + \text{Pi} \rightleftharpoons \alpha\text{-glucose-1-phosphate} + \text{fructose} \qquad (1\text{-}4)$$

現在知られているスクロースホスホリラーゼは主に単細胞微生物の菌体内酵素である。本酵素は最初に*Leuconostoc mesenteroides*にその活性が見いだされ[8)]、*Pseudomonas saccharophila*[9,10)]、*P. putrefaciens*[11)]などに存在が発見された。Weinbergらは3種のスクロースホスホリラーゼの性質の比較を行った[12)]。Doudoroffらは本酵素の逆反応を用いたスクロースの合成を報告した[9)]。この報告はス

クロースの*in vitro*での合成に関する最初のものである。スクロースホスホリラーゼはグルコース－1－リン酸と[^{32}P]リン酸との交換反応[13,14]およびリン酸の非存在下でのスクロースと[*U*-^{14}C]フルクトースの交換反応を行うことが報告された[14]。またリン酸の非存在下においてものアクセプターの交換反応を示し、いわゆるグルコシルトランスフェラーゼのような作用をすることが示された[13]。スクロースホスホリラーゼの逆反応において基質特異性は必ずしも厳密でなく、数種類の二糖の合成が可能であることが報告された[15,16]。酵素精製の報告は最初にSilversteinらにより*P. saccharophila*由来の酵素について行われた[14]。ゲル濾過による分子量80,000であり、遠心沈降法の結果から二量体構造を持つことが推定された。また酵素反応機構の研究も同時に行われ、ping pong機構により反応が進行していることが確認された。同報告中[14]でアクセプター分子の基質特異性が決定された。K_mはスクロースに対して2.5 mM, リン酸に対して1.8 mMと計算された。Voetらは*P. saccharophila*由来の精製酵素を用いて酵素の断片とβ結合したグルコースを単離し、反応がβ－グルコシル－酵素複合体を反応中間体として形成して進行することを示した[17]。MicyalらはP. *saccharophila*酵素のアクセプター特異性を系統的に調べた[18]。Goldらはα－グルコシルフロリドがα－グルコース－1－リン酸の変わりにグルコシルドナーとして作用することを報告した[19]。1988年にFerrettiらにより*Streptococcus mutans*由来のグルコシルトランスフェラーゼと考えられてクローニングされた遺伝子*gtfA*[20,21]産物のタンパクは、実際はグルコシルトランスフェラーゼではなくスクロースホスホリラーゼであったことがRussellらにより報告された[22]。この*S. mutans*由来の酵素がスクロースホスホリラーゼ遺伝子の最初にクローニングされた例である。組換スクロースホスホリラーゼの分子量は塩基配列から55,665と決定された。組換酵素を精製して分子量を調べた結果モノマー構造であることが示され、*P. saccharophila*由来の酵素とは異なっていた。*L. mesenteroides*由来の酵素の精製はKogaらにより1990年に報告された[23]。本酵素は分子量約5万のモノマーであると決定された。Kitaoらによりクローニングが行われ、塩基配列から分子量は55,749と計算された[24]。同報告によると*S. mutans gtfA*と68%のホモロジーを示したが、（スターチ）ホスホリラーゼとのホモロジーは見いだされなかった[24]。*L. mesenteroides*酵素のアクセプターの基質特異性はKitaoらにより検討され、酵素濃度が高い条件において

は各種の化合物をアクセプターとすることが報告された[25]。著者らは*L. mesenteroides*部分精製酵素を用いて、同酵素の反応機構を決定するとともに、速度パラメータの計算を行った[26]。その結果、反応機構は*P. saccharophila*由来の酵素と同じping pong機構であった。K_mは、スクロースに対して39 mM, リン酸に対して6.2 mMと計算された。この値は*P. saccharophila*由来の酵素の値とは大きく異なっていた。スクロースホスホリラーゼに関しては、数編の総説が提出されている[27-29]。

マルトースホスホリラーゼ[EC 2.4.1.8]は、(1-5)式に示したようにグルコース二分子がα-1,4結合した二糖であるマルトースを加リン酸分解してβ－グルコース－1－リン酸とグルコースを生じる可逆反応を触媒する酵素である。

maltose + Pi ⇌ β-glucose-1-phosphate + glucose (1-5)

現在知られているマルトースホスホリラーゼはすべて単細胞微生物の菌体内酵素である。その存在は最初にFittingらによって*Neisseria meningitidis*菌体抽出液に発見された[30]。また、β－グルコース－1－リン酸は本酵素の生成物からはじめて同定された化合物である。本酵素はグルコース-1-リン酸と[^{32}P]リン酸あるいはリン酸の非存在下にマルトースと[*U*-^{14}C]グルコース間の交換反応を示さないことからスクロースホスホリラーゼとの反応機構の違いが考察された[28,30]。本酵素のアクセプターの特異性はSelingerらにより報告され、3種類のマルトースアナログが合成された[28]。マルトースホスホリラーゼの場合にはアクセプターの交換反応はリン酸の存在下でのみ起こることが報告された[30,31]。Woodらはある種のビール乳酸菌に酵素活性が存在することを報告した[32]。Kamogawaらは*Lactobacillus brevis*由来の酵素を電気泳動的に均一に精製した[33]。分子量はゲル濾過で150,000, SDS-PAGEで80,000と決定され二量体構造が示唆された[33]。Tsumurayaらは、*L. brevis*由来の酵素が逆反応においてβ－グルコース－1－リン酸のほかにβ－グルコシルフロリドをもグルコシルドナーとして用いることが可能であることを示した[34]。同じ報告中で反応機構の決定も行われ、sequential機構により反応が進行していることが示された[34]。マルトースホスホリラーゼの遺伝子のクローニングはまだ報告されていない。

セロビオースホスホリラーゼ[EC 2.4.1.20]は、(1-6)式に示したようにグルコース二分子がβ-1,4結合した二糖であるセロビオースを加リン酸分解してα－グ

ルコース－1－リン酸とグルコースを生じる反応を触媒する酵素である。

cellobiose + Pi ⇌ α-glucose-1-phosphate + glucose (1-6)

本酵素は、Sihらにより最初に*Clostridium thermocellum*から発見された[35]。Sihらは本酵素を含む*C. thermocellum*の菌体抽出液を利用したセロビオースの合成について報告した[36]。セロビオースホスホリラーゼの存在は他に*Ruminococcus flavefaciens*[37,38]，*Cellvibrio gilvus*[39]，*Cellulomonas*[40-42]，*Fomes annos*[43]，*Erwinia* sp.[44]などに見いだされている。セロビオースホスホリラーゼはすべて単細胞微生物の菌体内酵素として存在している。セロビオースホスホリラーゼを生産する微生物の多くはセロビオースを主生成物として生じるセルラーゼ系を持つ特徴がある[45,46]。本酵素はセロビオースの菌体への取り込みあるいは取り込まれたセロビオースの代謝に関与しているものと考えられる。*C. thermocellum*はセロビオースホスホリラーゼの他にセロデキストリンホスホリラーゼを持っている[47,48]。前者はセロビオースのみを加リン酸分解しセロトリオースには全く作用しないが、後者はセロトリオース以上の重合度のオリゴ糖を加リン酸分解するがセロビオースには全く作用しないと報告されている。Alexanderは*C. thermocellum*の菌体抽出液よりセロビオースホスホリラーゼを部分精製し、その基質特異性などを明らかにした[49,50]。さらにAlexanderはその部分精製酵素を用いた数種類のヘテロオリゴ糖の合成について報告した[51]。酵素の所在はSchimzらにより*Cellulomonas* sp.について調べられ、cytosol画分に存在すると報告された[52]。セロビオースホスホリラーゼの均一タンパクまでの精製はSasakiらにより*C. gilvus*[53,54]由来の酵素について行われた。分子量はゲル濾過法により280,000，SDS-PAGEにより72,000と決定され四量体構造が示唆された[53]。田中らは*Erwinia* sp.[44,55]および*C. thermocellum*[56]のセロビオースホスホリラーゼの精製について報告し、両酵素とも分子量はゲル濾過で約160,000，SDS-PAGEで約80,000と決定し二量体構造を示唆した。酵素精製に関する報告は以上の三例があるが、セロビオースホスホリラーゼの作用機構に関する報告は現在まで行われていない。また遺伝子のクローニングに関しても報告されていない。

ラミナリビオースホスホリラーゼ[EC 2.4.1.31]は、(1-7)式に示したようにグルコース二分子がβ-1,3結合した二糖であるラミナリビオースを加リン酸分解してα－グルコース－1－リン酸とグルコースを生じる可逆反応を触媒する酵素で

ある。

laminaribiose + Pi ⇌ α-glucose-1-phosphate + glucose (1-7)

本酵素はラミナリトリオースにも弱いながら作用しα－グルコース－1－リン酸とラミナリビオースを生じる[57]。三糖以上のオリゴ糖にも作用し得る二糖類加リン酸分解酵素は本酵素のみである。ラミナリビオースホスホリラーゼは最初にGoldembergらにより*Euglena gracilis*の菌体内から発見された[57]。Mannersらは*Astacia ocellata*菌体内に同酵素を発見した[58]。ラミナリビオースホスホリラーゼはEuglenida族の原生動物あるいは微細藻類などの、菌体内に貯蔵多糖としてパラミロン（β-1,3-グルカン）を持つ単細胞微生物に存在が知られる[4,59]。最初の報告においてGoldembergらはラミナリビオースホスホリラーゼがリン酸の非存在下にラミナリビオースと[*U*-^{14}C]グルコースとの交換反応を触媒しないことを示した[57]。本酵素の部分精製は、*E. gracilis*由来の酵素に関して報告され[57,60,61]、基質特異性の違いからβ-1,3-オリゴグルカンホスホリラーゼ[EC 2.4.1.30][60-62]と区別された。しかしながら本酵素の均一蛋白までの精製は未だ報告されていないため、分子量などの蛋白化学的性質あるいは反応機構は未知である。

トレハロースホスホリラーゼ[EC 2.4.1.64]は、(1-8)式に示したようにグルコース二分子がα-1,α-1結合した非還元性二糖であるトレハロースを加リン酸分解してβ－グルコース－1－リン酸とグルコースを生じる可逆反応を触媒する酵素である。

trehalose + Pi ⇌ β-glucose-1-phosphate + glucose (1-8)

本酵素は、*E. gracilis*菌体内にその存在が知られている。Marechalらは*E. gracilis*の無細胞抽出液から本酵素を75倍に精製した[63]。同報文の中で、キシロースと6-デオキシグルコースはグルコースの代わりにアクセプターになり得ると報告されている[53]。トレハロースホスホリラーゼは、*E. gracilis*菌体内に蓄積される二糖であるトレハロースの分解及び合成の両方に関与していると言われている。トレハロースホスホリラーゼは研究例が少なく、均一タンパクまでの精製は報告されていない。また酵素化学的性質あるいは反応機構は明かではない。

加リン酸分解酵素の中で最もよく研究されている酵素であるホスホリラーゼはピリドキサルリン酸を含んだB_6酵素であることが知られている[7]。しかしながら同じような加リン酸分解反応を触媒する二糖類加リン酸分解酵素においては、ビ

リドキサルリン酸含んだ酵素の報告はない[7,33,53,54]。この点は二糖類加リン酸分解酵素とホスホリラーゼとの酵素化学的な最も大きな違いであると考えられる。

二糖類加リン酸分解酵素は切断されるグルコシドのアノマー型により二つのグループに分かれる。すなわちα－グルコシドを分解する酵素群（スクロース－，マルトース－，トレハロースホスホリラーゼ）およびβ－グルコシドを分解する酵素群（セロビオース－，ラミナリビオースホスホリラーゼ）の分類である。また生成するグルコース－1－リン酸のアノマー型からも分類することが可能である。この場合はα－グルコース－1－リン酸を生じる酵素群（スクロース－，セロビオース－，ラミナリビオースホスホリラーゼ）およびβ－グルコース－1－リン酸を生じる酵素群（マルトース－，トレハロースホスホリラーゼ）の二種類に分類される。この分類法は二糖類加リン酸分解酵素の反応を利用した糖の合成を考えるときに有用な分類となる。そのほかに反応の前後でアノマー型が保持されるか反転するかで分類することが可能である。Table 1-2に示したように、スクロースホスホリラーゼのみ反応の前後でアノマー型が保持されるがそのほかの4酵素は反転する。この分類は、酵素の反応機構と対応していると考えられる。

スクロースホスホリラーゼはリン酸の非存在下にスクロースと[U-^{14}C]フルクトース間の交換反応を触媒する[13]。マルトースホスホリラーゼ[30]及びラミナリビオースホスホリラー[57]ゼはリン酸の非存在下では二糖と[U-^{14}C]グルコース間の交換反応を触媒しないと報告されている。この点から保持型酵素と反転型酵素の反応機構についての考察が行われ、反応中間体の推定が行われている[28,30,64]。セロビオースホスホリラーゼとトレハロースホスホリラーゼに関しては交換反応については報告されていない。またスクロースホスホリラーゼの反応機構はping pong型であることがすでに報告されている。マルトースホスホリラーゼに関してはsequential型であることが最近報告された[34]。その他の3種の酵素ついては反応機構は報告されていない。

1－4．二糖類加リン酸分解酵素の利用に関するこれまでの研究

二糖類加リン酸分解酵素は、可逆的な加リン酸分解反応を触媒する。加リン酸分解反応の基質である二糖の結合様式特異性は非常に高く、例えばセロビオース

ホスホリラーゼはラミナリビオース，ゲンチオビオース，マルトースなどの結合様式の異なる二糖には全く作用しない。しかしながら逆反応においてはアクセプターの基質特異性は必ずしも厳密ではなく種々のアクセプターから二糖を合成することが可能である。この結合様式特異性は高いがアクセプターの基質特異性は必ずしも厳密ではない特徴を利用して、特定の二糖の定量あるいは二糖類の合成などを中心にさまざまな報告がなされている。

Doudoroffらは、スクロースホスホリラーゼの逆反応を利用してグルコース－1－リン酸とフルクトースからスクロースの*in vitro*の合成をはじめて報告した[9]。また、Doudoroffらはスクロースホスホリラーゼのアクセプターの基質特異性が厳密でないことを利用してグルコシルソルボシド，グルコシルキシルロシド，グルコシルアラビノースの合成について報告した[15]。グルコシルアラビノースのみ還元糖であることが確認され、その構造決定が行われた[65]。Palleroniらはスクロースホスホリラーゼを用いたグルコシルラムニュロシドの合成及びラムニュロースの単離について報告した[16]。Birnbergらはスクロースホスホリラーゼ，ホスホグルコムターゼ，グルコース－6－リン酸デヒドロゲナーゼの反応を組み合わせることによるスクロースの定量法を開発した[66]。同様の方法を用いた無機リン酸の定量法も提案されている[29]。Daurat-Larroqueらは、スクロースホスホリラーゼとホスホリラーゼの反応とを組み合わせて澱粉を原料としたスクロースの合成について報告した[67]。Chassyらは、スクロースホスホリラーゼを用いて部位特異的に^{14}Cによってラベルされたスクロースを合成した[68]。Vandammeらは、スクロースホスホリラーゼの性質と利用に関して優れた総説を発表している[29]。

Selingerらは、マルトースホスホリラーゼを用いてリン酸の存在下にマルトースとアクセプターとの転移反応を行い3種類のマルトースアナログのヘテロ二糖を合成した[31]。Kamogawaらは、マルトースホスホリラーゼによる加ヒ酸分解反応を利用したマルトースの分別定量を報告した[69]。Muraoらはマルトースホスホリラーゼとトレハロースホスホリラーゼとを組み合わせた反応を行いマルトースを原料としたトレハロースの合成を報告した[70]。

Alexanderはセロビオースホスホリラーゼの逆反応を利用した各種のヘテロオリゴ糖の合成及びオリゴ糖の構造について報告した[51]。Satoらは*Cellulomonas fimi*由来のセロビオースホスホリラーゼの逆反応を用い^{14}Cで標識したセロビオー

スを調製し、同菌のセロビオースの代謝についての研究を行った[40]。NgらはC. thermocellumのセロビオースホスホリラーゼを利用した標識セロビオースの合成について報告した[71]。Sasakiらは、セルロースの酵素分解により調製したセロビオースをセロビオースホスホリラーゼの反応により加リン酸分解して得たグルコース－1－リン酸を単離し、ホスホリラーゼの基質として使用することにより、セルロースから澱粉を合成する方法について報告した[72]。

1－5．本研究の展望

現在までI－2に示したように、二糖類加リン酸分解酵素について多くの酵素化学的性質が報告されている。しかしながら、スクロースホスホリラーゼ及びマルトースホスホリラーゼに関してはかなり研究が進んでいるが、それ以外の酵素については未だに不明の点が多いといわざるを得ない。以前からアノマー型変換の有無と反応機構の関係についていくつかの考察がなされていた[28,30,64]。しかしながら二糖類加リン酸分解酵素のうち反応機構がわかっていたものは、1980年代まではスクロースホスホリラーゼ[14]のみであり、1990年代になってもマルトースホスホリラーゼの反応機構[39]が報告されただけである。アノマー型の変換の有無は加水分解酵素にも見られる特徴である。例えばα－グルコシダーゼとグルコアミラーゼを比較すれば、触媒する反応は本質的に同様であるが、生成するグルコースのアノマー型は前者では保持され後者では反転する。α－グルコシダーゼは糖転移反応を触媒するものが多く、また転移活性は一般的に強いといわれている。グルコアミラーゼに関しては逆反応と明確に区別した意味での転移反応は示さない[1,73,74]。β－キシロシダーゼはアノマー型の保持されるものと反転されるもの二通りが知られているがこの場合も同様の傾向が示されている[74,75]。この関係はスクロースホスホリラーゼとマルトースホスホリラーゼの反応機構の関係と通じるところがある。すなわち、リン酸の非存在下にスクロースホスホリラーゼは転移反応を触媒するがマルトースホスホリラーゼは転移反応を触媒しない。ところで加水分解反応の速度解析を行うにあたっては、H_2O濃度を酵素の立体構造など反応に影響を与えずに制御することは現状では不可能であるため、Clelandの

提唱した反応機構[6]を調べることが難しい。このため、二糖類加リン酸分解酵素の反応機構を調べることは加水分解酵素の反応機構に関しても有用な知見を与えるものと考えられる。そこで本研究においては、未だ解析の進んでいないセロビオースホスホリラーゼ及びラミナリビオースホスホリラーゼを均一タンパクまで精製し、その酵素化学的性質を明らかにするとともに反応機構の解明を含めた反応初速度解析を行うことを目的とした。

二糖類加リン酸分解酵素の利用に関しても現在まで相当数の研究が行われている。しかしながら工業的に利用可能な反応系についての提案は多くない。二糖類加リン酸分解酵素はその逆反応を積極的に利用すればオリゴ糖の合成に利用価値が高いと考えられる。そこで、今回の研究では二糖類加リン酸分解酵素の新しい利用法についての検討を行うことを第二の目的とした。

第Ⅱ章．二糖類加リン酸分解酵素の精製と諸性質

Ⅱ－1．セロビオースホスホリラーゼに関する研究

Ⅱ-1-1.序

セロビオースホスホリラーゼ[EC 2.4.1.20]は、セロビオースを可逆的に加リン酸分解し、α－グルコース－1－リン酸(G-1-P)とグルコースを生成する反応を触媒する酵素である。その存在はまず最初にSihらにより*Clostridium thermocelum*に示された[35]。その後*Ruminococcus flavefaciens*[37,38]，*Cellvibrio gilvus*[39]，*Cellulomonas*[40-42]，*Erwinia* sp.[44,55]などのセルロース資化性バクテリアにその存在が示された。真核生物では現在まで、*Fomes annous*[43]にのみその存在が知られている。

酵素の精製に関する研究は、最初に1960年代に行われた。Alexanderは、*C. thermocellum*由来の酵素をゲル濾過，陰イオン交換クロマトグラフィーなどの方法により菌体抽出液から130倍に精製しその性質を調べた[49,50]。精製酵素の比活性は約3.3 U/mgであり、電気泳動的な均一性については確認されていない。同報告中に本酵素は逆反応においてグルコース以外に2-デオキシグルコース，6-デオキシグルコース，グルコサミン，マンノース，キシロースなどをアクセプターとして認識することが示された。逆反応においてグルコースによる基質阻害が観測された。Alexanderはグルコース以外の糖をアクセプターとした場合に生成する二糖の構造を決定し反応が位置特異的（グルコースの4位に相当する位置）で起こっていることを確認した[51]。

セロビオースホスホリラーゼの電気泳動的に均一な蛋白までの精製は1983年にSasakiらにより*C. gilvus*由来の酵素について報告された[53,54]。酵素蛋白は*C. gilvus*菌体抽出液よりヒドロキシアパタイト及び陰イオン交換クロマトグラフィーなどの方法により196倍に精製された。Native-PAGE，SDS-PAGE，ゲル濾過により蛋白の均一性が確認された。分子量はゲル濾過で280,000，SDS-PAGEで72,000と決定され四量体構造が示唆された。本酵素はピリドキサルリン酸を含まないこと、

およびMg^{2+}要求性が報告された。また精製の最終段階において酵素が不安定になることが報告された。

最近になり田中らは*Erwinia* sp.[44,53]および*C. thermocellum*[56]のセロビオースホスホリラーゼの均一蛋白までの精製を発表した。この報告によると両者の酵素ともに分子量はゲル濾過で約160,000, SDS-PAGEで約80,000と決定された。また両酵素とも反応にMg^{2+}要求性はないと報告された。セロビオースホスホリラーゼの精製に関する報告はここに示した*C. gilvus*, *Erwinia* sp., *C. thermocellum*の三起源についてのみ行われている。

セロビオースホスホリラーゼの性質は、*C. thermocellum*酵素について基質特異性を中心に調べられた報告はあるが[49-51]、反応機構あるいはアクセプター交換反応については十分に解明されていない。また、*C. gilvus*の酵素については、基質特異性などの十分なデータはまだ得られていない。そこで本研究においては、*C. gilvus*のセロビオースホスホリラーゼの酵素化学的性質を調べるとともに速度解析を行うことにした。また*C. gilvus*酵素は精製の後半に不安定になる性質がある[53,54]ためより迅速な精製法の確立が必要になる。また分子量あるいはMg^{2+}要求性などに他種起源の酵素との相違がみられるのでこの点の追試が必要であると考えられた。そこで本研究では*C. gilvus*由来のセロビオースホスホリラーゼの迅速な精製法の検討も併せて行った。

Ⅱ-1-2.方法

試薬

α-D-グルコース－1－リン酸（G-1-P）二カリウム塩，β-D-グルコース，β-D-セロビオースはSigma (St. Louis, USA)より購入した。α-D-セロビオース（5%のβ－アノマーを含む）は、セロビオース水溶液をエタノール沈澱させることにより調製した。疑似糖(5a-carba-α-およびβ-glucopyranose)は慶応大学理工学部教授小川誠一郎先生より御供与頂いた。その他の試薬は、試薬グレードの市販品を用いた。

セロビオースホスホリラーゼの精製

C. gilvus (ATCC 13127)の培養は5 l三角フラスコ中に1 lの培地を入れて30℃, 48 hr回転振盪培養することにより行った。培地組成は以下の通りである。(g/l) : バクトトリプトン (5), 酵母エキス (5), NaCl (5), K_2HPO_4 (2), D-セロビオース (5). 培養終了後遠心により集菌し得られた菌体を蒸留水で2度洗浄した。1 lの培養で湿重量約10 gの菌体を得た。

セロビオースホスホリラーゼは菌体内酵素であるため、菌体より酵素の抽出した後に精製操作を行った。菌体湿重量10 gを50 mlの50 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)(緩衝液A)に分散し超音波破砕処理を行った。処理液を遠心することにより菌体粗抽出液を得た。粗抽出液に硫酸プロタミンを終濃度0.1%になるまで加え沈澱を遠心除去した。さらに上清に硫酸アンモニウムを40%飽和濃度になるまで加え、生じた沈澱を遠心除去した。得られた溶液を20%飽和の硫酸アンモニウムを含む緩衝液Aで平衡化したButyl-Toyopearl 650S (東ソー, 東京) カラム(1.5 cm径×10 cm)にかけ、カラムを100 mlの20%飽和濃度の硫酸アンモニウムを含んだ緩衝液Aで洗浄後、緩衝液Aによる硫酸アンモニウム濃度20%飽和～10%飽和の直線的濃度勾配(200 ml)により疎水性クロマトグラフィーを行った。セロビオースホスホリラーゼ活性画分を集め、硫酸アンモニウムを55%飽和まで加えることにより、酵素を沈澱させた。沈澱を遠心により回収し、適当量の緩衝液Aに溶解した。その溶液を緩衝液Aで平衡化したDEAE-Toyopearl 650S (東ソー) カラム(1.5 cm径×10 cm)にかけ、カラムを0.15 M NaClを含んだ緩衝液Aで洗浄後、緩衝液AによるNaCl 0.15～0.25 Mの直線的濃度勾配(200 ml)により陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。活性画分を50 mM トリス－塩酸緩衝液(pH 7.0) (緩衝液B) に対して透析したものを精製セロビオースホスホリラーゼ溶液として使用した。

定量法

タンパク質はウシ血清アルブミン(BSA)を標準としてBradfordの方法[76]により測定した。G-1-Pは、ホスホグルコムターゼ－グルコース－6－リン酸デヒドロゲナーゼ法により測定した[77]。グルコースは、ムタロターゼを併用したグルコースオキシダーゼ法によるグルコースCテスト Wako (和光純薬, 大阪) を用いて定量した[78]。無機リン酸は、Lowry-Lopetzの方法により測定した[79]。

酵素活性測定法

セロビオースホスホリラーゼによる酵素反応は5 mM $MgCl_2$, 0.02% BSAを含んだ緩衝液B中で37℃にて行った。加リン酸分解反応はセロビオースとPiより生成するG-1-Pあるいはグルコースを定量することにより測定した。また合成反応はG-1-Pとグルコースより生成するPiを定量することにより測定した。また酵素1 Uは上記条件において10 mM セロビオース, 10 mM Piより毎分1 μmolのG-1-Pあるいはグルコースを生じる酵素量として定義した。

電気泳動

Native-PAGEは、Davisの方法[80]に従い、PAG Plate 4/15（第一化学薬品, 東京）を用いて行った。タンパクはCoomasie Brilliant Blue R-250で染色した[81]。ゲル上の活性はSasakiらの方法[53]に従い検出した。SDS-PAGEは、Laemmliの方法[82]に従い、SDS-PAG Plate 4/20（第一化学薬品）を用いて行った。ゲルの染色はnative-PAGEと同様の方法で行った。IEF-PAGEはPhastSystem (Pharmacia-LKB, Uppsala, Sweden)を用い、PhastGel IEF 3-9上でマニュアルに記載された方法に従って行った。

ゲル濾過

ゲル濾過は、カラムにTSKgel SW3000SW$_{XL}$ (7.8 mm径×30 cm, 東ソー, 東京）を用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により行った。移動相には0.3 M NaClを含んだ0.1 Mリン酸緩衝液(pH 7.0)を流速1 ml/minの条件で用いた。

[U-^{14}C]グルコース交換反応

セロビオースとグルコースの交換反応は、[U-^{14}C]グルコースを用いて以下の条件により行った。100 μlの緩衝液B中、10 mM セロビオース, 10 mM [U-^{14}C]グルコース（放射比活性 3.7 Ci/mol), 5 mM $MgCl_2$, 0.02% BSA, 0.14 U/ml セロビオースホスホリラーゼになるよう反応液を調製し、室温で24 hr反応を行った。なお、セロビオースホスホリラーゼは、精製酵素を再度疎水性クロマトグラフィーにかけることによりPiを完全に除去してから用いた。対照として20 mM Piを含む

ものおよび酵素を含まないものを同様に反応させた。反応終了後、5 μl の反応液をToyo No. 50濾紙(20 cm X 20 cm)にスポットし、n-ブタノール／ピリジン／水(6:4:4 by vol.)の溶媒系で上昇法によりペーパークロマトグラフィーを行った。展開終了後、濾紙を乾燥して、X線フィルムに重ねて3日間露光を行いオートラジオグラムを作成した。

速度パラメータ

速度パラメータの計算はClelandにより示されているGauss-Newton法に基づいた方法[83]に従い最小自乗法を適用して計算した。計算はそれぞれの場合によりN88-BASICを用いてプログラムを作成して行った[26]。一基質反応の場合はProgram 1を、二基質反応のうち、ping pong mechanismのものにはProgram 2を、sequential mechanismのものにはProgram 3を、拮抗基質阻害現象に対してはProgram 4を適用した。

Program 1. 一基質反応計算用

```
10 '*****************************************************************
20 '*                                                               *
30 '*    Program for Kinetic Parameters for One Substrate Reaction   *
40 '*            by the Method of Cleland (Talor expansion)          *
50 '*                                                               *
60 '*        March 2 1989    by Motomitsu Kitaoka                   *
70 '*                                                               *
80 '*****************************************************************
100 PRINT "Input the number of the data."
110 INPUT N
142   PRINT "input Km"
144   INPUT K0
150  DIM V(N):DIM S(N):DIM X(N):DIM Y(N)
160 FOR I=1 TO N
170  READ S(I),V(I)
180 NEXT I
190 FOR II=1 TO 10
200  SX=0:SY=0:SX2=0:SY2=0:SXY=0:SXV=0:SYV=0
210  FOR I=1 TO N
220   X(I)=S(I)/(K0+S(I))
230   Y(I)=S(I)/(K0+S(I))/(K0+S(I))
240   SX2=SX2+X(I)*X(I):SY2=SY2+Y(I)*Y(I)
250   SXY=SXY+X(I)*Y(I):SXV=SXV+X(I)*V(I):SYV=SYV+Y(I)*V(I)
255  NEXT I
260    AVAL=(SXV*SY2-SYV*SXY)/(SX2*SY2-SXY*SXY)
270    BVAL=(SYV*SX2-SXV*SXY)/(SX2*SY2-SXY*SXY)
280   VMAX=AVAL:K0=K0-BVAL/AVAL
290   PRINT II;"  Km=";K0;"  Vmax=":VMAX
310 NEXT II
320 PRINT "Continue (y/n)"
330 INPUT LL$
340 IF LL$="n" THEN END
350 IF LL$="N" THEN END
352 IF LL$="y" THEN 190
354 IF LL$="Y" THEN 190
360 GOTO 320
```

Program 2. 二基質反応(ping-pong bi bi)計算用

```
10 '*****************************************************************
20 '*                                                               *
30 '*   Program for Kinetic Parameters for Two Substrate Reaction   *
40 '*        by the Method of Cleland (Taylor Expansion)            *
50 '*      (Ping-Pong Bi Bi)                                        *
60 '*                                                               *
70 '*    April 24 1990   by Motomitsu Kitaoka                       *
80 '*                                                               *
90 '*****************************************************************
100 REM   v=Vmax*S1*S2/(Km2*S1+Km1*S2+S1*S2)
110 PRINT "Input the number of the data."
120 INPUT N
130  PRINT "input Km1,Km2"
140  INPUT K10,K20
150 DIM V(N):DIM S1(N):DIM S2(N):DIM X(N):DIM Y(N):DIM Z(N)
160 FOR I=1 TO N
170   READ S1(I),S2(I),V(I)
180 NEXT I
190 FOR II=1 TO 10
200  SX2=0:SY2=0:SZ2=0:SXY=0:SXZ=0:SYZ=0:SXV=0:SYV=0:SZV=0
210  FOR I=1 TO N
220   X(I)=S1(I)*S2(I)/(K20*S1(I)+K10*S2(I)+S1(I)*S2(I))
230   Y(I)=X(I)/(K20*S1(I)+K10*S2(I)+S1(I)*S2(I))*S2(I)
240   Z(I)=X(I)/(K20*S1(I)+K10*S2(I)+S1(I)*S2(I))*S1(I)
250    SX2=SX2+X(I)*X(I):SY2=SY2+Y(I)*Y(I):SZ2=SZ2+Z(I)*Z(I)
260    SXY=SXY+X(I)*Y(I):SXZ=SXZ+X(I)*Z(I):SYZ=SYZ+Y(I)*Z(I)
270    SXV=SXV+X(I)*V(I):SYV=SYV+Y(I)*V(I):SZV=SZV+Z(I)*V(I)
280  NEXT I
290  A1=SX2:B1=SXY:C1=SXZ:D1=SXV
300  A2=SXY:B2=SY2:C2=SYZ:D2=SYV
310  A3=SXZ:B3=SYZ:C3=SZ2:D3=SZV
320    AA1=A1*C3-A3*C1:BB1=B1*C3-B3*C1:DD1=D1*C3-D3*C1
330    AA2=A2*C3-A3*C2:BB2=B2*C3-B3*C2:DD2=D2*C3-D3*C2
340   AVAL=(DD1*BB2-DD2*BB1)/(AA1*BB2-AA2*BB1)
350   BVAL=(DD1*AA2-DD2*AA1)/(BB1*AA2-BB2*AA1)
360   CVAL=(D1-A1*AVAL-B1*BVAL)/C1
370  VMAX=AVAL:K10=K10-BVAL/AVAL:K20=K20-CVAL/AVAL
380  PRINT II;"  Km1=";K10;"  Km2=";K20;"  Vmax=";VMAX
390 NEXT II
400 PRINT "continue (y/n)"
410 INPUT LL$
420 IF LL$="n" THEN END
430 IF LL$="N" THEN END
440 IF LL$="y" THEN 190
450 IF LL$="Y" THEN 190
460 GOTO 410
```

Program 3. 二基質反応(sequential bi bi)計算用

```
10 '*****************************************************************
20 '*                                                               *
30 '*    Program for Kinetic Parameter for Two Substrates Reaction   *
40 '*        by the Method of Cleland (Taylor Expansion)             *
50 '*     Sequential Bi Bi                                           *
60 '*                                                               *
70 '*      August 15 1989   by Motomitsu Kitaoka                    *
80 '*                                                               *
90 '*****************************************************************
100 REM v=Vmax*S1*S2/(Ki1*Km2+S1*Km2+S2*Km1+S1*S2)
110 PRINT "Input the number of the data."
120 INPUT N
130  PRINT "Input Km1,Km2,Ki1"
140  INPUT K10,K20,KI0
150 DIM V(N):DIM S1(N):DIM S2(N):DIM X(N):DIM Y(N):DIM Z(N):DIM W(N)
160 FOR I=1 TO N
170   READ S1(I),S2(I),V(I)
180 NEXT I
190 FOR II=1 TO 10
200  SX2=0:SY2=0:SZ2=0:SW2=0:SXY=0:SXZ=0:SXW=0:SYZ=0:SYW=0:SZW=0
210  SXV=0:SYV=0:SZV=0:SWV=0
220  FOR I=1 TO N
230   X(I)=S1(I)*S2(I)/(KI0*K20+S1(I)*K20+S2(I)*K10+S1(I)*S2(I))
240   Y(I)=X(I)/(KI0*K20+S1(I)*K20+S2(I)*K10+S1(I)*S2(I))*S2(I)
250   Z(I)=X(I)/(KI0*K20+S1(I)*K20+S2(I)*K10+S1(I)*S2(I))*(KI0+S1(I))
260   W(I)=X(I)/(KI0*K20+S1(I)*K20+S2(I)*K10+S1(I)*S2(I))*K20
270     SX2=SX2+X(I)*X(I):SY2=SY2+Y(I)*Y(I):SZ2=SZ2+Z(I)*Z(I)
280     SW2=SW2+W(I)*W(I):SXY=SXY+X(I)*Y(I):SXZ=SXZ+X(I)*Z(I)
290     SXW=SXW+X(I)*W(I):SYZ=SYZ+Y(I)*Z(I):SYW=SYW+Y(I)*W(I)
300     SZW=SZW+Z(I)*W(I):SXV=SXV+X(I)*V(I):SYV=SYV+Y(I)*V(I)
310     SZV=SZV+Z(I)*V(I):SWV=SWV+W(I)*V(I)
320  NEXT I
330   A1=SX2:B1=SXY:C1=SXZ:D1=SXW:E1=SXV
340   A2=SXY:B2=SY2:C2=SYZ:D2=SYW:E2=SYV
350   A3=SXZ:B3=SYZ:C3=SZ2:D3=SZW:E3=SZV
360   A4=SXW:B4=SYW:C4=SZW:D4=SW2:E4=SWV
370    AA1=A1/D1-A4/D4:BB1=B1/D1-B4/D4:CC1=C1/D1-C4/D4:EE1=E1/D1-E4/D4
380    AA2=A2/D2-A4/D4:BB2=B2/D2-B4/D4:CC2=C2/D2-C4/D4:EE2=E2/D2-E4/D4
390    AA3=A3/D3-A4/D4:BB3=B3/D3-B4/D4:CC3=C3/D3-C4/D4:EE3=E3/D3-E4/D4
400     AAA1=AA1/CC1-AA3/CC3:BBB1=BB1/CC1-BB3/CC3:EEE1=EE1/CC1-EE3/CC3
410     AAA2=AA2/CC2-AA3/CC3:BBB2=BB2/CC2-BB3/CC3:EEE2=EE2/CC2-EE3/CC3
420       AVAL=(EEE1*BBB2-EEE2*BBB1)/(AAA1*BBB2-AAA2*BBB1)
430       BVAL=(EEE1*AAA2-EEE2*AAA1)/(BBB1*AAA2-BBB2*AAA1)
440       CVAL=(EE1-AA1*AVAL-BB1*BVAL)/CC1
450       DVAL=(E1-A1*AVAL-B1*BVAL-C1*CVAL)/D1
460   VMAX=AVAL:K10=K10-BVAL/AVAL:K20=K20-CVAL/AVAL:KI0=KI0-DVAL/AVAL
```

```
470  PRINT II;"  K1=";KI0;"  K2=";K20;"  Ki=";KI0;"  Vmax=";VMAX
480 NEXT II
485 PRINT "continue (y/n)"
490  INPUT LL$
500  IF LL$="n" THEN END
510  IF LL$="N" THEN END
520  IF LL$="y" THEN 190
530  IF LL$="Y" THEN 190
540  GOTO 490
```

Program 4. 二基質反応拮抗基質阻害計算用

```
10 '*****************************************************************
20 '*                                                               *
30 '*    Program for Kinetic Parameter for Two Substrates Reaction  *
40 '*        by the Method of Cleland (Taylor Expansion)            *
50 '*     Ordered Bi Bi  with Competed Substrate Inhibition         *
60 '*                                                               *
70 '*      August 17 1989   by Motomitsu Kitaoka                    *
80 '*                                                               *
90 '*****************************************************************
100 REM v=Vmax*S1*S2/(a+b*S2+c*S1+S1*S2+d*S2^2+e*S2^3)
110 PRINT "Input the number of the data."
120 INPUT N
130  PRINT "Input a,b,c,d,e"
140  INPUT A0,B0,C0,D0,E0
150 DIM V(N):DIM S1(N):DIM S2(N):DIM X(N):DIM Y(N):DIM Z(N):DIM W(N):DIM
 U(N)
155 DIM T(N)
160 FOR I=1 TO N
170   READ S1(I),S2(I),V(I)
180 NEXT I
190 FOR II=1 TO 10
200  SX2=0:SY2=0:SZ2=0:SW2=0:SXY=0:SXZ=0:SXW=0:SYZ=0:SYW=0:SZW=0
210  SXV=0:SYV=0:SZV=0:SWV=0:SU2=0:SXU=0:SYU=0:SZU=0:SWU=0:SUV=0
215  SXT=0:SYT=0:SZT=0:SWT=0:SUT=0:ST2=0:STV=0
220  FOR I=1 TO N
225   FV=A0+B0*S2(I)+C0*S1(I)+S1(I)*S2(I)+D0*S2(I)^2+E0*S2(I)^3
230   X(I)=S1(I)*S2(I)/FV
240   Y(I)=X(I)/FV
250   Z(I)=X(I)/FV*S2(I)
260   W(I)=X(I)/FV*S1(I)
265   U(I)=X(I)/FV*S2(I)^2
267   T(I)=X(I)/FV*S2(I)^3
270     SX2=SX2+X(I)*X(I):SY2=SY2+Y(I)*Y(I):SZ2=SZ2+Z(I)*Z(I)
280     SW2=SW2+W(I)*W(I):SXY=SXY+X(I)*Y(I):SXZ=SXZ+X(I)*Z(I)
290     SXW=SXW+X(I)*W(I):SYZ=SYZ+Y(I)*Z(I):SYW=SYW+Y(I)*W(I)
300     SZW=SZW+Z(I)*W(I):SXV=SXV+X(I)*V(I):SYV=SYV+Y(I)*V(I)
310     SZV=SZV+Z(I)*V(I):SWV=SWV+W(I)*V(I):SU2=SU2+U(I)*U(I)
315     SXU=SXU+X(I)*U(I):SYU=SYU+Y(I)*U(I):SZU=SZU+Z(I)*U(I)
316     SWU=SWU+W(I)*U(I):SUV=SUV+U(I)*V(I):ST2=ST2+T(I)*T(I)
317     SXT=SXT+X(I)*T(I):SYT=SYT+Y(I)*T(I):SZT=SZT+Z(I)*T(I)
318     SWT=SWT+W(I)*T(I):SUT=SUT+U(I)*T(I):STV=STV+T(I)*V(I)
320  NEXT I
330   A1=SX2:B1=SXY:C1=SXZ:D1=SXW:E1=SXU:F1=SXT:G1=SXV
340   A2=SXY:B2=SY2:C2=SYZ:D2=SYW:E2=SYU:F2=SYT:G2=SYV
350   A3=SXZ:B3=SYZ:C3=SZ2:D3=SZW:E3=SZU:F3=SZT:G3=SZV
360   A4=SXW:B4=SYW:C4=SZW:D4=SW2:E4=SWU:F4=SWT:G4=SWV
```

```
365   A5=SXU:B5=SYU:C5=SZU:D5=SWU:E5=SU2:F5=SUT:G5=SUV
367   A6=SXT:B6=SYT:C6=SZT:D6=SWT:E6=SUT:F6=ST2:G6=STV
370 A11=A1-A6*F1/F6:B11=B1-B6*F1/F6:C11=C1-C6*F1/F6:D11=D1-D6*F1/F6:E11=
E1-E6*F1/F6:G11=G1-G6*F1/F6
372 A12=A2-A6*F2/F6:B12=B2-B6*F2/F6:C12=C2-C6*F2/F6:D12=D2-D6*F2/F6:E12=
E2-E6*F2/F6:G12=G2-G6*F2/F6
374 A13=A3-A6*F3/F6:B13=B3-B6*F3/F6:C13=C3-C6*F3/F6:D13=D3-D6*F3/F6:E13=
E3-E6*F3/F6:G13=G3-G6*F3/F6
376 A14=A4-A6*F4/F6:B14=B4-B6*F4/F6:C14=C4-C6*F4/F6:D14=D4-D6*F4/F6:E14=
E4-E6*F4/F6:G14=G4-G6*F4/F6
378 A15=A5-A6*F5/F6:B15=B5-B6*F5/F6:C15=C5-C6*F5/F6:D15=D5-D6*F5/F6:E15=
E5-E6*F5/F6:G15=G5-G6*F5/F6
380 A21=A11-A15*E11/E15:B21=B11-B15*E11/E15:C21=C11-C15*E11/E15:D21=D11-
D15*E11/E15:G21=G11-G15*E11/E15
382 A22=A12-A15*E12/E15:B22=B12-B15*E12/E15:C22=C12-C15*E12/E15:D22=D12-
D15*E12/E15:G22=G12-G15*E12/E15
384 A23=A13-A15*E13/E15:B23=B13-B15*E13/E15:C23=C13-C15*E13/E15:D23=D13-
D15*E13/E15:G23=G13-G15*E13/E15
386 A24=A14-A15*E14/E15:B24=B14-B15*E14/E15:C24=C14-C15*E14/E15:D24=D14-
D15*E14/E15:G24=G14-G15*E14/E15
390 A31=A21-A24*D21/D24:B31=B21-B24*D21/D24:C31=C21-C24*D21/D24:G31=G21-
G24*D21/D24
392 A32=A22-A24*D22/D24:B32=B22-B24*D22/D24:C32=C22-C24*D22/D24:G32=G22-
G24*D22/D24
394 A33=A23-A24*D23/D24:B33=B23-B24*D23/D24:C33=C23-C24*D23/D24:G33=G23-
G24*D23/D24
400 A41=A31-A33*C31/C33:B41=B31-B33*C31/C33:G41=G31-G33*C31/C33
402 A42=A32-A33*C32/C33:B42=B32-B33*C32/C33:G42=G32-G33*C32/C33
410 AVAL=(G41*B42-G42*B41)/(A41*B42-A42*B41)
412 BVAL=(G41*A42-G42*A41)/(B41*A42-B42*A41)
414 CVAL=(G31-A31*AVAL-B31*BVAL)/C31
416 DVAL=(G21-A21*AVAL-B21*BVAL-C21*CVAL)/D21
418 EVAL=(G11-A11*AVAL-B11*BVAL-C11*CVAL-D11*DVAL)/E11
420 FVAL=(G1-A1*AVAL-B1*BVAL-C1*CVAL-D1*DVAL-E1*EVAL)/F1
430 VMAX=AVAL:A0=A0-BVAL/AVAL:B0=B0-CVAL/AVAL:C0=C0-DVAL/AVAL
432 D0=D0-EVAL/AVAL:E0=E0-FVAL/AVAL
440 PRINT II;"  a=";A0;"  b=";B0;"  C=";C0;"  d=";D0;"  e=";E0;"  Vmax="
;VMAX
480 NEXT II
485 PRINT "continue (y/n)"
490  INPUT LL$
500  IF LL$="n" THEN END
510  IF LL$="N" THEN END
520  IF LL$="y" THEN 190
530  IF LL$="Y" THEN 190
540  GOTO 490
```

Ⅱ-1-3.結果

酵素精製

セロビオースホスホリラーゼの精製結果をTable 2-1に示した。菌体粗抽出液から22%の収率で比活性40.8 U/mgまで精製できた。比活性は、145倍上昇した。精製された酵素はNative-, SDS-PAGEで均一な蛋白バンドを示した(Fig. 2-1)。分子量はゲル濾過で約180,000(Fig. 2-2)、SDS-PAGEで約85,000(Fig. 2-3)と測定された。本酵素蛋白は二量体構造を持つものと推定される。この結果はSasakiら[53,54]の報告値を修正するものであり、*Erwinia*[44,55]および*C. thermocellum*[56]由来の酵素の結果と一致する。IEF-PAGEにより等電点を求めた結果、pI 6.0と決定された。Sasakiらによれば本酵素はMg^{2+}を要求すると報告されているが[53,54]、今回要求性を再検討した結果本酵素はMg^{2+}を要求しないことが判明した。またMg^{2+}は酵素反応に全く影響を与えなかった。この点においても、*Erwinia*[44,55]および*C. thermocellum*[56]由来の酵素の結果と一致した。

Table 2-1. Summary of the purification of the cellobiose phosphorylase

	Volume (ml)	Activity (U)	Protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)
Crude extract	52	96.3	343	0.28	100
Protamine sulfate	52	86.3	328	0.26	90
40% Sat. $(NH_4)_2SO_4$	54	56.2	254	0.22	58
Butyl-Toyopearl	25	45.3	6.6	7.3	47
55% Sat. $(NH_4)_2SO_4$	25	38.3	5.5	7.0	40
DEAE-Toyopearl	24	21.6	0.53	41	22

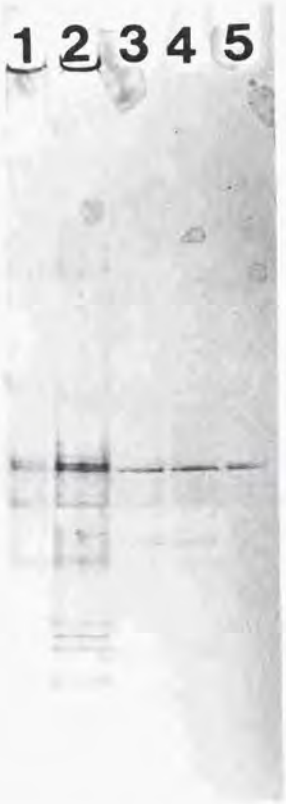


Fig. 2-1. Native PAGE of the cellobiose phosphorylase.

Lane 1, protamin sulfate supernatant; Lane 2, 40% sat. ammonium sulfate supernatant; Lane 3, Butyl-Toyopearl eluate; Lane 4, 55% sat. ammonium sulfate precipitate; Lane 5, DEAE-Toyopearl eluate.

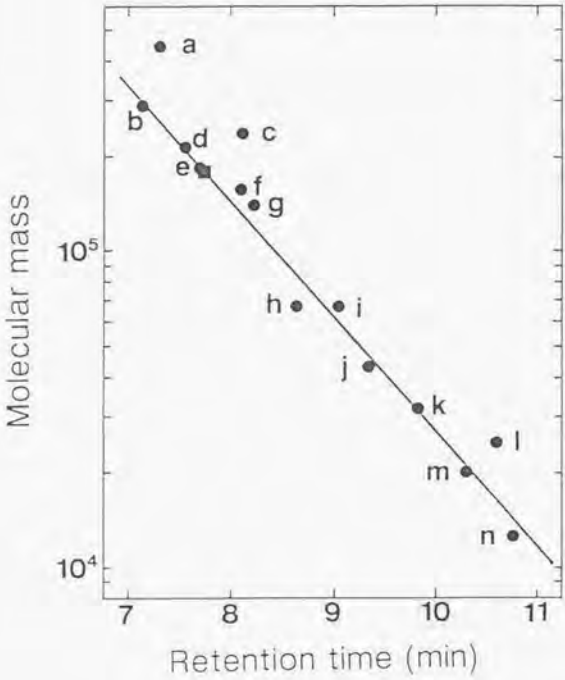


Fig. 2-2. Calibration of the molecular mass of the cellobiose phosphorylase by the gel filtration method.

The following standard proteins were used: a, ferritin; b, glutamate dehydrogenase; c, catalase; d, sweet potate β-amylase; e, phosphorylase *b*; f, aldolase; g, lactate dehydrogenase; h, bovine serum albumin; i, enolase; j, ovalbumin; k, adenylate kinase; l, chymotrypsinogen; m, soy bean trypsin inhibitor; n, cytochrome *c*. The cellobiose phosphorylase is indicated as ■.

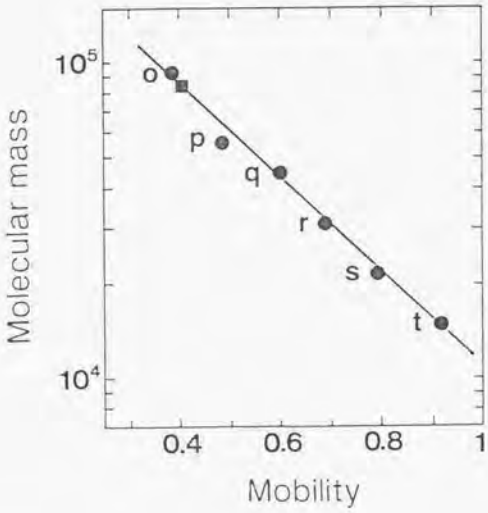


Fig. 2-3. Calibration of the molecular mass of the cellobiose phosphorylase by SDS-PAGE.

The following standard proteins were used: o, phosphorylase b; p, bovine serum albumin; q, ovalbumin; r, carbonic anhydrolase; s, soy bean trypsin inhibitor; t, lysozyme. The cellobiose phosphorylase is indicated as ■.

[U-^{14}C]グルコース交換反応

セロビオース－[U-^{14}C]グルコース間の交換反応の有無を調べたオートラジオグラムをFig. 2-4に示した。本酵素はリン酸の非存在下においてセロビオースへの放射能の取り込みは観測されなかった。対照実験の結果はリン酸の存在下には放射能の取り込みが観測された。酵素反応のメカニズムのモデルとして、グルコシル－酵素複合体形成の有無により以下の２通りのものが考えられている。前者のモデルにおいては、リン酸の非存在下にセロビオースとグルコースが存在すれば、(2-1).(2-2)両式の平衡反応が成立し結果として交換反応が起こる。後者においては、リン酸が存在しなければ(2-5)式のみしか成立しないため交換反応が起こらない。また、後者のモデルにおいてリン酸が存在すれば(2-5)～(2-9)式すべてが成立することになり交換反応が観測される。なお後者のモデルの酵素基質の結合順序は一例を示したものであり、リン酸が先に酵素に結合するモデルあるいは基質の結合順が決まっていないモデルも可能である。しかしながらいずれのモデルを用いても得られる結果は同じである。セロビオースホスホリラーゼで得られた結果は、リン酸非存在下に交換反応が検出されないため、後者のメカニズムによっていることを示すものである。なお、[U-^{14}C]グルコース交換反応の実験においては、酵素と基質の結合順序を決定することはできない。

a)グルコシル－酵素複合体を形成するモデル

$$E + CG_2 \rightleftharpoons E\text{-}CG_2 \quad (2\text{-}1)$$

$$E\text{-}CG_2 \rightleftharpoons E\text{-}Glc + Glc \quad (2\text{-}2)$$

$$E\text{-}Glc + Pi \rightleftharpoons E\text{-}G\text{-}1\text{-}P \quad (2\text{-}3)$$

$$E\text{-}G\text{-}1\text{-}P \rightleftharpoons E + G\text{-}1\text{-}P \quad (2\text{-}4)$$

b)グルコシル－酵素複合体を形成しないモデル

$$E + CG_2 \rightleftharpoons E\text{-}CG_2 \quad (2\text{-}5)$$

$$E\text{-}CG_2 + Pi \rightleftharpoons E\text{-}CG_2Pi \quad (2\text{-}6)$$

$$E\text{-}CG_2Pi \rightleftharpoons E\text{-}G\text{-}1\text{-}PGlc \quad (2\text{-}7)$$

$$E\text{-}G\text{-}1\text{-}PGlc \rightleftharpoons E\text{-}G\text{-}1\text{-}P + Glc \quad (2\text{-}8)$$

$$E\text{-}G\text{-}1\text{-}P \rightleftharpoons E + G\text{-}1\text{-}P \quad (2\text{-}9)$$

(E:酵素, CG_2:セロビオース)

Fig. 2-4. Autoradiogram of the D-[U-^{14}C]glucose exchange reaction.

Lane 1, without Pi; Lane 2, with 20 mM Pi; Lane 3, without the enzyme. G_1 and G_2 mean D-glucose and D-cellobiose, respectively.

速度解析による作用機構解明

本酵素の作用機構を調べるため、セロビオースの加リン酸分解反応においてリン酸濃度を何点かに固定してセロビオース濃度と反応初速度の量逆数プロットを作成した。Fig. 2-5に示したように第二象現上で一点に収束する線群が得られた。この結果は本酵素の反応が、Cleland[6]の提唱したsequential bi bi機構によっていることを示している。この結果は、[U-^{14}C]グルコース交換反応で得られたものと一致する。さらに詳しい反応機構を調べるために、生成物(G-1-P, グルコース)の基質に対する阻害の型を調べ、結果をFig. 2-6に示した。その結果、セロビオースに対するG-1-Pの組合せのみが拮抗型の阻害を示し、他はすべて非拮抗型（混合型）であった。この結果はセロビオースホスホリラーゼの反応機構が(2-10)～(2-14)式の順序で反応が起こるordered bi bi機構であることを示している[6]。

$$E + A \rightleftharpoons E\text{-}A \tag{2-10}$$

$$E\text{-}A + B \rightleftharpoons E\text{-}AB \tag{2-11}$$

$$(E\text{-}AB \rightleftharpoons E\text{-}QP) \tag{2-12}$$

$$E\text{-}QP \rightleftharpoons E\text{-}Q + P \tag{2-13}$$

$$E\text{-}Q \rightleftharpoons E + Q \tag{2-14}$$

(E:酵素, A:セロビオース, B:Pi, P:グルコース, Q:G-1-P)

反応速度式は以下のように現される。

$$v = \frac{V_{max}[A][B]}{K_{iA}K_{mB} + K_{mB}[A] + K_{mA}[B] + [A][B]} \tag{2-15}$$

速度パラメータはprogram 2を用いて計算された。計算結果は、V_{max} = 1.43 μmol/min·U, K_{iA} = 6.8 m$\underline{M}$, K_{mA} = 2.6 m$\underline{M}$, K_{mB} = 0.61 m$\underline{M}$であった。この計算値は、Fig. 2-5に示したように、実測値とよく一致していた。

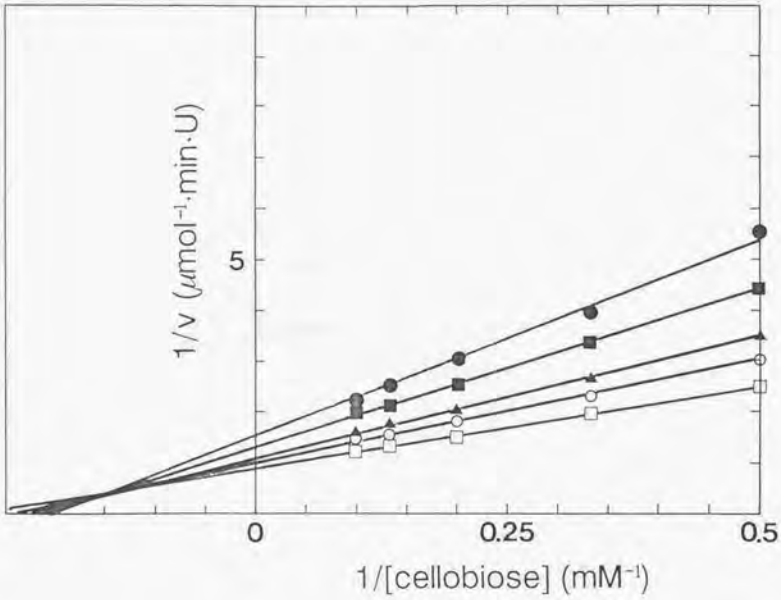


Fig. 2-5. The 1/v-1/[cellobiose] plot on the phosphorolysis.

The initial concentrations of Pi were: ●, 0.5 mM; ■, 0.667 mM; ▲, 1 mM; ○, 1.33 mM; □, 2 mM.

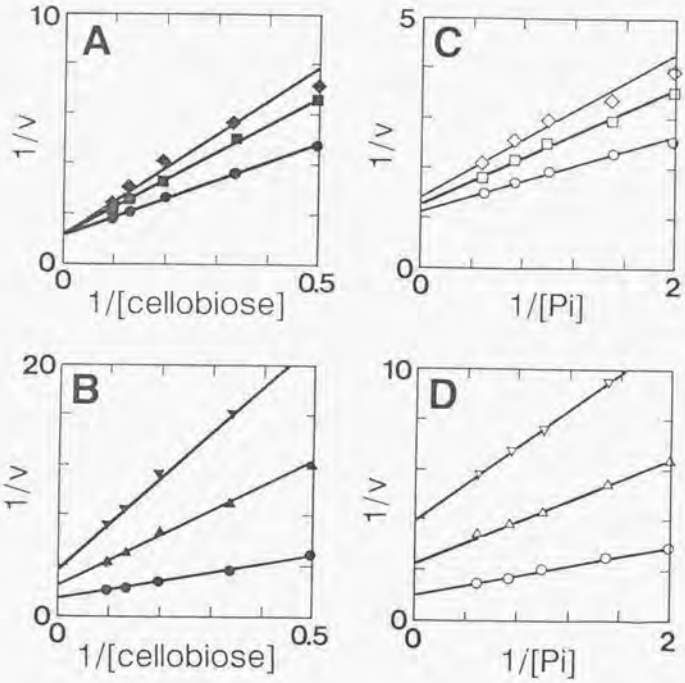


Fig. 2-6. Inhibition patterns of the products against the substrates.

A, G-1-P against cellobiose; B, glucose against cellobiose; C, G-1-P against Pi; D, glucose against Pi. The initial concentrations of the other substrate were 0.5 mM Pi (A, B) and 5 mM cellobiose (C, D). Those of the inhibitors were: G-1-P, ■□, 1mM, ◆◇, 2 mM; glucose, ▲△, 2 mM, ▼▽, 4 mM; ●○, none. Values of 1/v and 1/[S] are indicated in $\mu mol^{-1} \cdot min$-U and mM^{-1}, respectively.

基質特異性

本酵素の合成反応におけるアクセプターの基質特異性を調べた。結果をTable 2-2に示した。グルコースの他にマンノース，2-デオキシグルコース，グルコサミン，6-デオキシグルコース，キシロースがアクセプターとして作用した。結果を系統的にまとめると次のようになる。グルコースの1位，3位，4位，5位の誘導体は、アクセプターとして作用しなかった。それに対して、グルコースの2位，6位の異性体の一部はアクセプターとして作用した。基質濃度が10 mM の時はグルコースが最も良いアクセプターとなった。この結果は、本酵素の基質認識に対して、1位，3位，4位，5位の構造が重要な役割を果たしていることが示唆された。それと比較して2位と6位の構造は酵素によって認識されるものの、その重要性は比較的低かった。

Table 2-2. Substrate specificity for the glucosyl acceptor of the cellobiose phosphorylase

Substrate	v	Substrate	v
D-Glucose	1.37	D-Fructose	-
α-Methyl-D-glucoside	-	L-Sorbose	-
β-Methyl-D-glucoside	-	D-Lyxose	-
1,5-Anhydro-D-glucitol	-	D-Ribose	-
D-Mannose	0.054	L-Arabinose	-
2-Deoxy-D-glucose	0.034	D-Arabinose	-
D-Glucosamine	0.12	L-Xylose	-
N-Acetyl-D-glucosamine	-	*myo*-Inositol	-
D-Allose	-	D-Glucono-δ-lactone	-
D-Galactose	-	D-Glucitol	-
L-Idose	-	D-Mannitol	-
6-Deoxy-D-glucose	0.70		
D-Glucuronic acid	-		
D-Xylose	0.055		

Values are indicated as μmol/min·U. Minus (-) means under 0.03.

それぞれの基質の見かけの速度パラメータをTable 2-3に示した。その結果グルコースが最も低いK_m値を示した。2-デオキシグルコースと6-デオキシグルコース

とを比較して6-デオキシグルコースがより低いK_m値と高いV_{max}値を示したことから2位の水酸基が6位の水酸基よりも強く認識されていることが示唆された。また、6-デオキシグルコースはグルコースよりもむしろ大きいV_{max}値を示すのに対して、キシロースは約30%のV_{max}値を示した。また両者のK_m値は前者が後者の約1/4であった。この結果、6位の水酸基は酵素との結合のみにしか関与しないが、メチレン基は反応速度にも影響を及ぼしていることが示された。

Table 2-3. Apparent kinetic parameters toward various substrates of the cellobiose phosphorylase.

	K_m (mM)	V_{max} (μmol/min·U)
D-Glucose[a]	2.1	1.7
D-Mannose[b]	115	0.68
2-Deoxy-D-glucose[b]	168	0.64
D-Glucosamine[c]	13	0.26
6-Deoxy-D-glucose[d]	24	2.4
D-Xylose[b]	84	0.54

Values are calculated at the following concentrations:
a, 2-10 mM; b, 5-100 mM; c, 5-20 mM; and d, 2.5-50 mM.

1位の誘導体に関して、両メチルグルコシド及び1,5-アンヒドログルシトール（1-デオキシグルコピラノース）がアクセプターにならなかったことから本酵素がαあるいはβいずれかのアノメリック水酸基を認識している可能性が示された。どちらのアノマー型を認識しているかを確認するために、それぞれのアノマー型のグルコースの反応性を調べた。実験はグルコースのみ含まない反応液を37℃に保持し規定量のいずれかのアノマー型のグルコースを急速に溶解させることにより反応を開始することにより行った。結果をFig. 2-7に示した。G-1-P 10 mM, グルコース1 mMの反応条件において明らかにβアノマーがαアノマーよりよい反応性を示した。この結果は本酵素が1位のエカトリアル水酸基を認識していることを示唆している。また同様にPi 10 mM, α-あるいはβ-セロビオース 1 mMの条件での加リン酸分解反応を調べたところβ体の方が反応性が高かった。

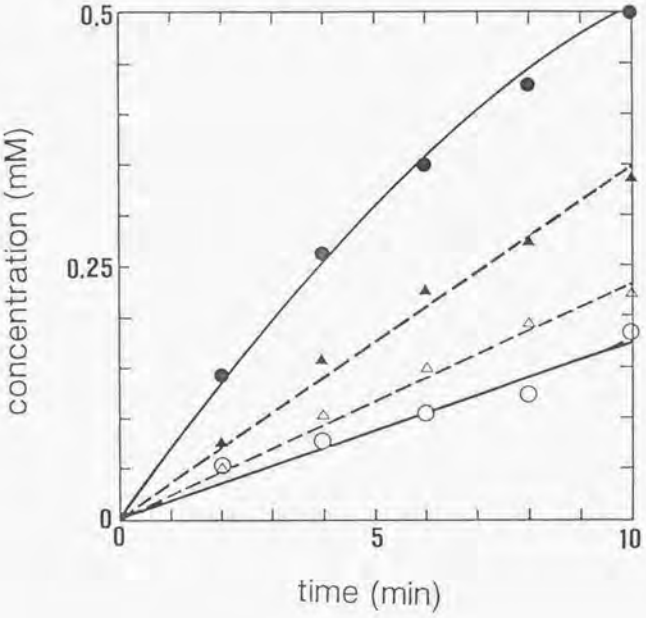


Fig. 2-7. Time course of the reactions with the substrates of both anomeric configuration.

○, α-glucose; ●, β-glucose; △, α-cellobiose; ▲, β-cellobiose. Solid and broken lines indicate synthetic and phosphorolytic reactions, respectively. The synthetic reaction was carried out using 1 mM α- or β-glucose with 10 mM G-1-P, and was followed by measuring the amount of Pi liberated. The phosphorolytic reaction was done using 1 mM α- or β-cellobiose with 10 mM Pi, and was followed by measuring the amount of glucose produced.

疑似糖を用いたアノマー特異性の検討

セロビオースホスホリラーゼはアクセプター分子のアノマー型を認識し、β体がα体よりよく反応することが示された。しかしながら糖を急速に溶解させて行う実験では変旋光の影響が無視できないため、α－アノマーは少しは本酵素の基質になるのか全くならないのか結論できない。そこで疑似糖を用いたアノマー特異性の実験を行った。疑似糖(pseudo-sugar, 5a-carba-aldopyranose)はグルコピラノースの環酸素原子をメチレン基に置き換えた構造(5-hydroxymethyl-1,2,3,4-cyclohexanetetrol)を持つ化合物である[84]。20 mM 5a-carba-α-及びβ-DL-glucopyranose[85](DL-(1,2,4/3,5)-5-hydroxymethyl-cyclohexanetetrol, DL-(1,3,5/2,4)-5-hydroxymethyl-cyclohexanetetrol, Fig. 2-8)をアクセプターとして10 mM G-1-P存在下に合成反応を行ったところβ体は、グルコースと比較して約22%の反応速度を示したが、α体は全く反応性を示さなかった(0.1%以下)。この結果はグルコースの場合もα－アノマーは事実上全く認識されないことを強く示唆している。5a-Carba-β-DL-glucopyranseの見かけの速度パラメータはK_m= 93 mM, V_{max} 1.7 μmol/min·Uと計算された(Fig. 2-9)。この結果はK_m値がグルコースの約50倍でありV_{max}値はグルコースとほぼ同じであった(Table 2-3)。50 mMのα体は5 mMのβ体の反応を全く阻害しなかった。光学活性体の5a-carba-β-D-glucopyranose[86]の見かけの速度パラメータはK_m 55 mM, V_{max} 1.6 μmol/min·Uと計算された(Fig. 2-9)。この結果はラセミ体の約半分のK_m値と同じV_{max}値を示し、D体のみ反応していることを示唆している。直接的に証明するため、ラセミ体より生成する疑似二糖を単離し^{13}C-NMRによりその構造決定を行った。反応液として1 mlの200 mM G-1-P, 200 mM 5a-carba-β-DL-glucopyranose, 0.7 U/mlセロビオースホスホリラーゼを含む緩衝液Bを調製し、30℃において6 hr反応を行った。反応液のPi濃度は67 mMに達し、反応液をTLC（展開溶媒：80%アセトニトリル）で分析したところ、二糖に相当する位置に新しいスポットが生じた。反応液を煮沸し酵素を失活させた後Toyopearl HW40S（東ソー, 2.5 cm径×40 cm）カラムを用いたゲル濾過（溶媒：水）により二糖画分を単離し、凍結乾燥により23 mgの白色粉末を得た。単離物はSomogyi[87]-Nelson[88]法により還元力を示さず、疑似二糖であることが示唆された。単離物の^{13}C-NMRスペクトルを重水中ジオキサンを内部標準として(67.4 ppm)JNM-GX260分光器（日本分光, 東京）により測定した。その結

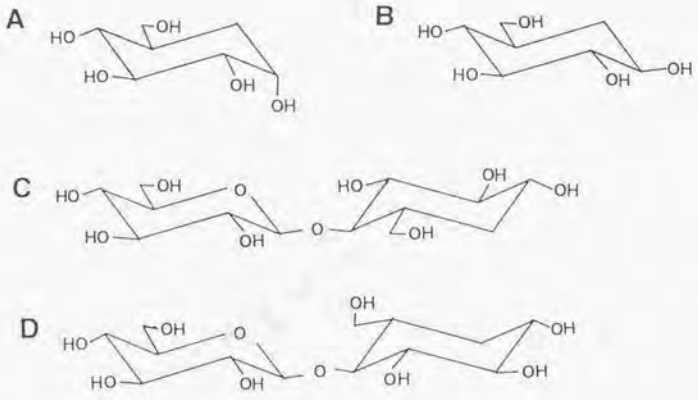


Fig. 2-8. Structure of pseudo-sugars.

A, 5a-carba-α-D-glucopyranose; B, 5a-carba-β-D-glucopyranose; C, 4-O-β-D-glucopyranosyl-5a-carba-β-D-glucopyranose (pseudo-cellobiose); D, 4-O-β-D-glucopyranosyl-5a-carba-β-L-glucopyranose.

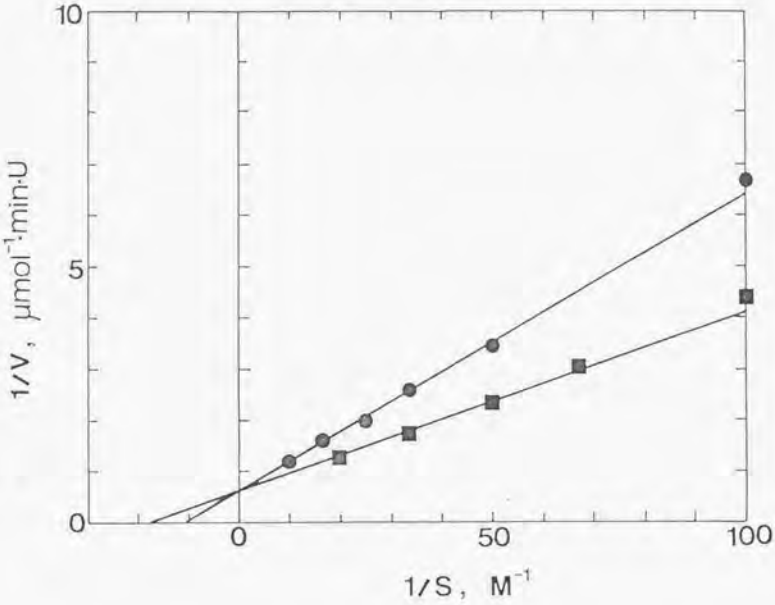


Fig. 2-9. The double reciprocal plot between the initial velocity and the initial consentration of 5a-carba-β-DL- or D-glucopyranose.

●, the DL-form; ■, the D-form.

果、4-*O*-β-D-glucopyranosyl-5a-carba-β-D-glucopyranose[89](Fig. 2-8, C)に相当する13個の吸収[90]が観測された(Table 2-4)。4-*O*-β-D-glucopyranosyl-5a-carba-β-L-glucopyranose[89](Fig. 2-8, D)に相当するシグナル[90]は観測されなかった。以上の結果によりD体のみが反応に関与していることが明らかになった。

Table 2-4. Assingments of chemical shifts on a ^{13}C-NMR spectrum of the pseudo-disaccharide formed.

5a-Carba-glucose residue		Glucosyl residue	
C1	71.6	C1'	103.7
C2	77.5	C2'	74.2
C3	76.0	C3'	76.5
C4	84.0	C4'	70.2
C5	40.5	C5'	76.9
C6	62.2	C6'	61.3
C7	32.4		

Values are given in δ ppm.

合成反応の解析

各アクセプターの濃度－反応初速度プロットを作成しFig. 2-10に示した。キシロース、マンノース、2-デオキシグルコースは通常のMichaelis-Menten型の曲線を示したが、グルコース、グルコサミン、6-デオキシグルコースでは高濃度側で理論線とのずれが生じた。この現象は特にグルコースの場合に顕著であり、反応速度の極大点を生じた。各G-1-P濃度に対してグルコース濃度－反応初速度のプロットを作成したところ(Fig. 2-11)、G-1-P濃度が高くなるにつれて極大を示すグルコース濃度も高くなることが示された。

グルコース濃度を固定してG-1-P濃度と反応初速度との両逆数プロットを作成すると、すべてのグルコース濃度に対して直線を示した(Fig. 2-12)。この結果は、G-1-Pはグルコースの結合サイトを阻害していないことを示している。G-1-Pに対するK_m*app*およびV_{max}*app*をグルコース濃度に対してプロットを行うと、V_{max}*app*は通常のMichaelis-Menten型の曲線を示すが、K_m*app*は直線ではなく放物線を示した(Fig. 2-13)。前者の結果は、グルコースはG-1-Pに対して拮抗的に阻害している

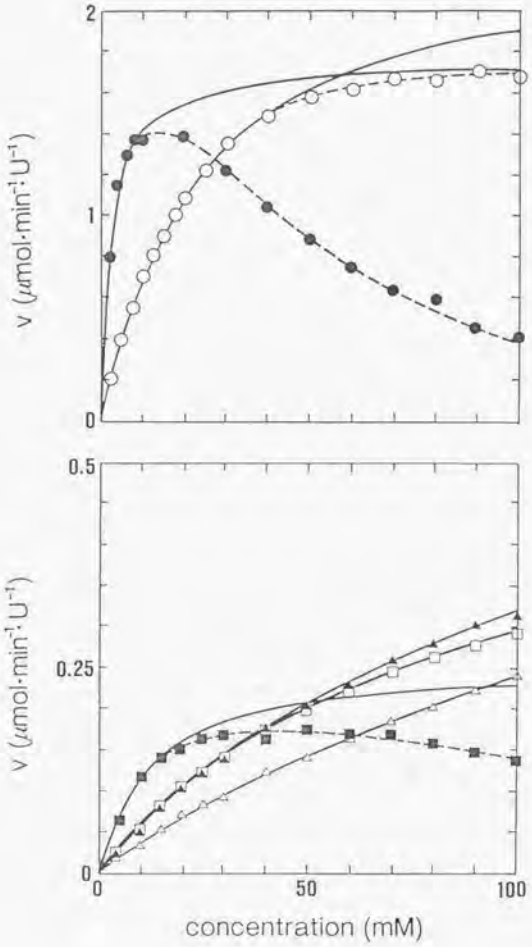


Fig. 2-10. The v-[S] plots of the various glucosyl acceptors.

●, D-glucose; ○, 6-deoxy-D-glucose; ▲, D-mannose; △, 2-deoxy-D-glucose; ■, D-glucosamine; □, D-xylose. Solid lines are theoretical curves using the Michaelis-Menten equation with the data on Table 2-3.

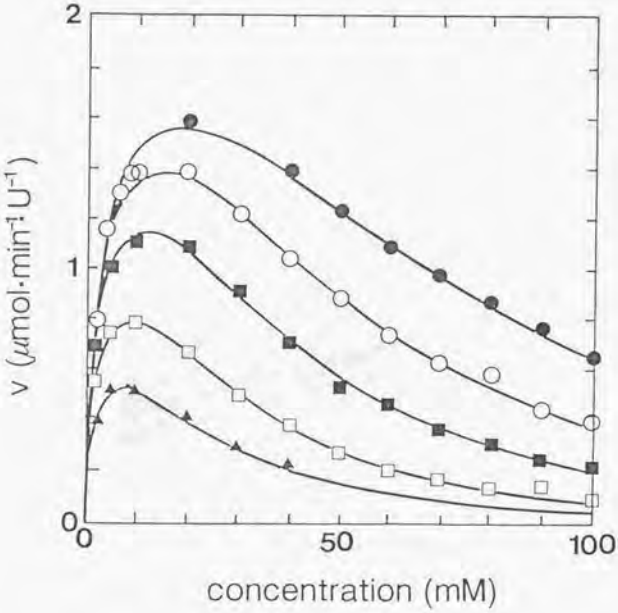


Fig. 2-11. The v-[Glc] plot at various [G 1-P].

Initial concentrations of G-1-P are: ▲, 1 mM; □, 2 mM; ■, 5 mM; ○, 10 mM; ●, 20 mM. Lines are theoretical ones.

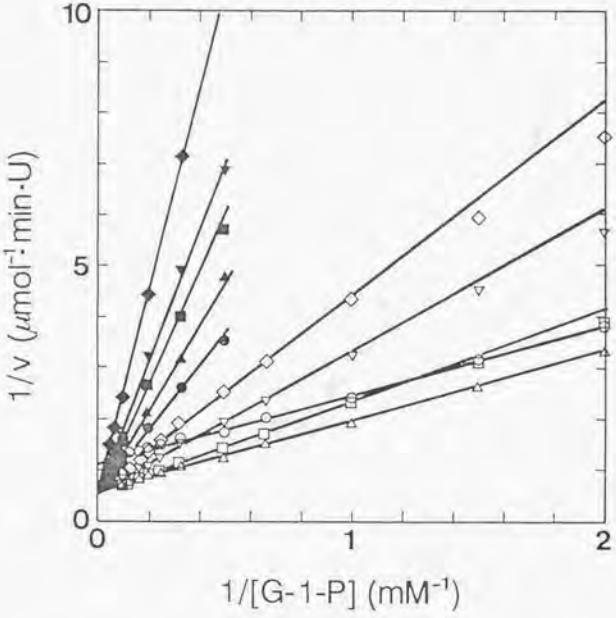


Fig. 2-12. The 1/v-1/[G-1-P] plot at various [Glc].

Intial concentrations of D-glucose are: ○, 2 mM; △, 10 mM; □, 20 mM; ▽, 30 mM; ◇, 40 mM; ●, 50 mM; ▲, 60 mM; ■, 70 mM; ▼, 80 mM, ◆, 100 mM.

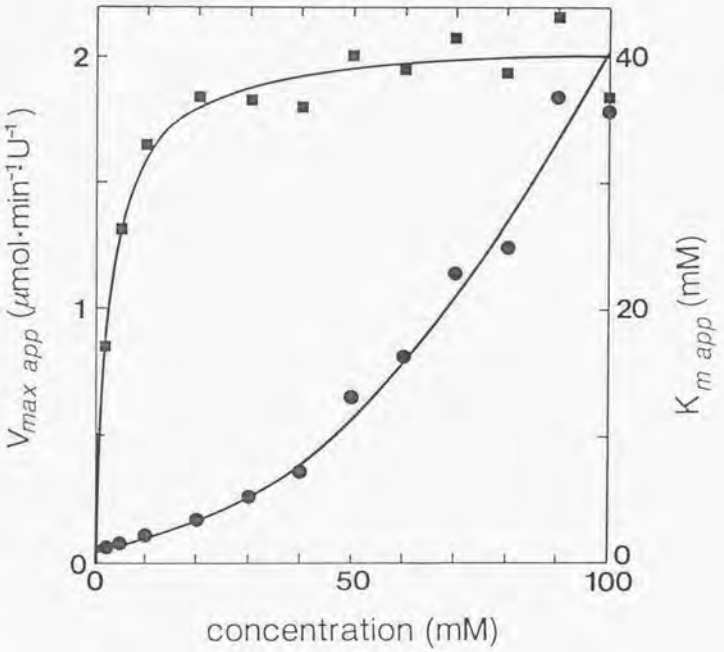


Fig. 2-13. The $K_m app$- and $V_{max} app$-[Glc] plots.

●, $K_m app$; ■, $V_{max} app$.

ことを示し、後者は、阻害現象がグルコース濃度の自乗によることを示している。

この阻害の原因はアクセプターであるグルコースがドナーであるG-1-Pのアナログとして作用するため起こる阻害現象にあると推定して、Fig. 2-14に示すモデルを提出した。そうすると本酵素の反応機構はordered bi bi mechanismであることを既に確認しているため、この阻害現象は式(2-16)～(2-20)で表されることになる。なお式中では解析を容易にするために逆反応に関する反応素過程は考慮しなかった。

$$E + Q \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftharpoons}} E\text{-}Q \tag{2-16}$$

$$E\text{-}Q + P \underset{k_{-2}}{\overset{k_{+2}}{\rightleftharpoons}} E\text{-}QP \tag{2-17}$$

$$E\text{-}QP \xrightarrow{k_{+3}} E + A + B \tag{2-18}$$

$$E + P \underset{k_{-11}}{\overset{k_{+11}}{\rightleftharpoons}} E\text{-}P \tag{2-19}$$

$$E + PP \underset{k_{-12}}{\overset{k_{+12}}{\rightleftharpoons}} E\text{-}PP \tag{2-20}$$

以上の式から定常状態法により以下の式が得られる。

$$v = k_{+3}[E\text{-}QP]$$

$$d[E\text{-}Q]/dt = k_{+1}[E][Q] - k_{-1}[E\text{-}Q] - k_{+2}[E\text{-}Q][P] + k_{-2}[E\text{-}QP] = 0 \tag{2-21}$$

$$d[E\text{-}QP]/dt = k_{+2}[E\text{-}Q][P] - (k_{-2} + k_{+3})[E\text{-}QP] = 0 \tag{2-22}$$

$$d[E\text{-}P]/dt = k_{+11}[E][P] - k_{-11}[E\text{-}P] - k_{+12}[E\text{-}P][P] + k_{-12}[E\text{-}PP] = 0 \tag{2-23}$$

$$d[E\text{-}PP]/dt = k_{+12}[E\text{-}P][P] - k_{-12}[E\text{-}PP] = 0 \tag{2-24}$$

$$[E]_0 = [E] + [E\text{-}Q] + [E\text{-}QP] + [E\text{-}P] + [E\text{-}PP] \tag{2-25}$$

これらの式をv, $[E]_0$について解くと以下の速度式が得られる。

$$v = \frac{V_{max}[Q][P]}{K_{iQ}K_{mP} + \left(K_{mQ} + \frac{K_{iQ}K_{mP}}{K_{i1}}\right)[P] + K_{mP}[Q] + [Q][P] + \left(\frac{K_{iQ}K_{mP}}{K_{i1}K_{i2}} + \frac{K_{mQ}}{K_{i1}}\right)[P]^2 + \frac{K_{mQ}}{K_{i1}K_{i2}}[P]^3}$$

$$(V_{max} = k_{+3}[E]_0,\ K_{iQ} = k_{-1}/k_{+1},\ K_{mQ} = k_{+3}/k_{+1},\ K_{mP} = (k_{-2} + k_{+3})/k_{+2}$$

$$K_{i1} = k_{-11}/k_{+11},\ K_{i2} = k_{-12}/k_{+12}) \tag{2-26}$$

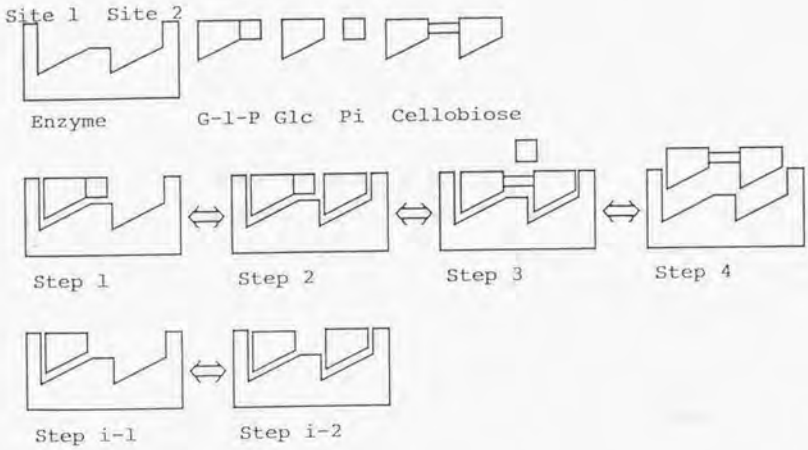


Fig. 2-14. A proposed model of competitive substrate inhibition.

ここで得られた速度式にGauss-Newton法[33]を容易に適用できるようにするために各係数に対して次のように整理する。

$$v=V_{max}[Q][P]/(a+b[P]+c[Q]+[Q][P]+d[P]^2+e[P]^3) \quad (2\text{-}27)$$

Gauss-Newton法をa,b,c,d,eに対して適用し、program 4を使用してそれぞれを最小自乗法により以下のように計算した。

$(a,\ b,\ c,\ d,\ e,\ V_{max})=(1.41,\ 1.99,\ 2.83,\ 1.43\times10^{-2},\ 3.90\times10^{-3},\ 2.07)$

各速度パラメータは以下のように決定された。

$V_{max}=2.07\ \mu mol/min\cdot U$, $K_{iG}=0.5$ mM, $K_{mG}=2.0$ mM, $K_{mP}=2.8$ mM, $K_{I1}=170$ mM, $K_{I2}=3.0$ mM

合成反応のV_{max}値は加リン酸分解反応の値の1.45倍であった。ここで得られた速度パラメータを用いた理論線は実測値とよく一致した(Fig. 2-11)。従ってFig. 2-14に提出したモデルはグルコースによる阻害現象を説明するモデルとして妥当であると結論される。

Ⅱ-1-4.考察

セロビオースホスホリラーゼの反応機構は本研究の結果sequential機構の一種であるordered機構と決定された。これは保持型酵素であるスクロースホスホリラーゼの結果(ping pong機構)[14]と明らかに異なっていた。セロビオースホスホリラーゼと同じ反転型の酵素であるマルトースホスホリラーゼの反応もsequential型であると報告されている[34]。本研究の結果は二糖類加リン酸分解酵素に関しては、アノマー反転の有無と反応機構が対応していることを示すものである。ラミナリビオースホスホリラーゼも[*U*-^{14}C]グルコース交換反応を行わないことが報告されており[62]sequential機構であることが示唆されている。ラミナリビオースホスホリラーゼの反応機構決定についてはⅡ－2で述べる。また二糖類加リン酸分解酵素の反応機構に関する詳しい考察はⅡ－3で行う。

*C. gilvus*のセロビオースホスホリラーゼのアクセプターの基質特異性は本質的に*C. thermocellum*の酵素[49,50]と同様であった。*Neisseria meningitidis*のマルトースホスホリラーゼもよく似た特異性を示すが[30]、2位の誘導体に関して異なっていた。セロビオースホスホリラーゼはグルコースと2-デオキシグルコースを

アクセプターとしたときに明確な反応性の差を示すため、2位水酸基の認識サイトを持つと考えられる。マルトースホスホリラーゼではこの差はない[30]ためこのような認識サイトは持たないと考えられる。このことはセロビオースホスホリラーゼに関して、グルコサミンが2-デオキシグルコースよりも低いK_m値を持つが、2位の嵩高い置換体（*N*-アセチルグルコサミン）は全く基質にならない点，マルトースホスホリラーゼに関しては嵩高い置換が反応に全く影響を及ぼさない点（*N*-アセチルグルコサミンとグルコースのアクセプター活性が同じ）[30]により支持される。

セロビオースホスホリラーゼの、アノマーを限定したグルコースに対するアクセプターとしての反応性を調べた結果、本酵素に対してβ体がα体よりも反応性が高いことが示された。しかしながらこの実験においては、変旋光の影響を見積もることが難しいため、α－アノマーの反応性の有無についての結論は得られない。ところで、セロビオースホスホリラーゼではアクセプターのアノメリック水酸基は酵素反応が行われる位置の反対側にあたる。酵素反応においてアノマー型が認識がされる例として、グルコースオキシダーゼ[91]、キシロースイソメラーゼ[32,93]，α－グルコシダーゼの逆反応[94]などが例としてあげられる。しかしながらこれらは直接反応を受ける部位のアノマー型を認識するものであり、セロビオースホスホリラーゼの場合とは異なっている。セロビオースホスホリラーゼと似た例としてはグルコアミラーゼの逆反応[94]が報告されている。最近Tsumurayaらは、マルトースホスホリラーゼがアクセプターとしてグルコースのα－アノマーに対して特異的に作用することを示した[34]。この報告においては反応を0℃において行いアノマー型を厳密に制御することにより、β－アノマーはほとんど反応性を示さないことを明らかにしている。しかしアノマー型の厳密な制御は難しい実験方法を伴う。そこでセロビオースホスホリラーゼのα－アノマーに対する反応性を簡単な方法で見積もるために疑似糖を用いた実験を行った。

疑似糖はピラノース環の酸素原子をメチレン基に置換した分子であり[89]、糖の環状構造アナログとしての可能性が期待されるものである[95]。疑似糖は変旋光を示さないため、これを用いて得られた結果は変旋光の影響を全く含まないと考えられる。セロビオースホスホリラーゼに対して疑似糖をアクセプターとした実験は、5a-carba-β-DL-glucopyranoseが、そのα体に比べて少なくとも200倍以上の

活性を示す結果が得られた。これは、本酵素は実質的にグルコースのβ－アノマーのみを認識していることを示唆している。本研究は疑似糖を精製酵素のアノマー特異性を調べる実験に使用した最初のものであり、これらを糖の環状構造アナログとして用いることの有用性を示す結果が得られた。さらに本研究は、（精製）酵素が疑似糖を基質として用い反応を行うことを示した最初の報告である。

合成反応にみられる基質阻害について、Fig. 2-14に示したモデルにより、(2-26)式が得られた。(2-26)から、一定のグルコース濃度におけるG-1-Pの見かけの速度パラメータの値はそれぞれ以下のように計算される。

$$K_m app = \frac{K_{iQ}K_{mP} + (K_{mQ} + \frac{K_{iQ}K_{mP}}{K_{i1}})[P] + \frac{K_{mQ}}{K_{i1}}[P]^2 + \frac{K_{mQ}}{K_{i1}K_{i2}}[P]^3}{K_{mP} + [P]} \quad (2\text{-}28)$$

$$V_{max}app = V_{max}[P]/(K_{mP} + [P]) \quad (2\text{-}29)$$

(2-28)式は分子にグルコース濃度の3乗項を含み2次式になっているため、Fig. 2-13における[Glc]－$K_m app$プロットが放物線を示すことと合致している。これは、Fig. 2-14のモデルによりに現象の説明ができることを示している。また(2-29)式は、[Glc]－$V_{max}app$プロットがMichaelis-Menten型の曲線になることを示しており、Fig. 2-13に示した結果と一致する。(2-26)式によって得られる理論線と実測値はよい一致を示す(Fig. 2-11)ことと併せて、Fig. 2-14に示したモデルの妥当性が強く示唆される。

そのほかに考えられる阻害機構のモデルとして、Fig. 2-14中のstep 1-2を除外したモデルが考えられる。すなわち式(2-16)～(2-20)において(2-20)を無視したものであり、サイト1にG-1-Pアナログとしてグルコースが結合した後にサイト2にはグルコースが結合しないと考えるモデルである。この場合次のような反応初速度式が得られる。

$$v = \frac{V_{max}[Q][P]}{K_{iQ}K_{mP} + (K_{mQ} + \frac{K_{iQ}K_{mP}}{K_{i1}})[P] + K_{mP}[Q] + [Q][P] + \frac{K_{mQ}}{K_{i1}}[P]^2} \quad (2\text{-}30)$$

(2-30)式から$K_m app$を計算すると次の式が得られる。

$$K_m app = \frac{K_{iQ}K_{mP} + (K_{mQ} + \frac{K_{iQ}K_{mP}}{K_{i1}})[P] + \frac{K_{mQ}}{K_{i1}}[P]^2}{K_{mP} + [P]} \quad (2\text{-}31)$$

(2-31)は、グルコース濃度に対して1次式であるためFig. 2-13の放物線を説明

することができない。すなわちstep i-2を経る酵素とグルコース2分子の3分子複合体形成がこの阻害現象に対して重要な役割を果たしているものであると考えられる。

セロビオースホスホリラーゼにおける基質阻害は、二基質反応における一方の基質がもう一方の基質に対して拮抗的に阻害する現象で説明できる。この現象を拮抗基質阻害(competitive substrate inhibition)と呼ぶことを提案する。

このような拮抗阻害現象は、セロビオースホスホリラーゼの他にラミナリビオースホスホリラーゼ[57]，ホスホグルコムターゼ[96]において報告例がみられる。しかしながら速度論的な解析は十分には行われていなかった。本研究は拮抗基質阻害現象を速度論的に厳密に解析しそれを説明するモデルを提出した最初の報告である。またこの阻害現象はマルトースホスホリラーゼ，トレハロースホスホリラーゼでも観測されることが予想される。

Ⅱ－2．ラミナリビオースホスホリラーゼに関する研究

Ⅱ-2-1.序

ラミナリビオースホスホリラーゼ[EC 2.4.1.31]は、ラミナリビオースを可逆的に加リン酸分解し、G-1-Pとグルコースを生成する反応を行う酵素である。本酵素は*Euglena gracilis*[57,61]，*Astasia ocellate*[58]などのEuglenida目に属する原生動物あるいは微細藻類にその存在が知られる。この酵素は、これらの微生物が菌体内に持つ貯蔵多糖であるパラミロン（直鎖β-1,3グルカン）を分解する酵素系のうち最終段階を受け持つ酵素である[59]。パラミロンの分解は、エンド型及びエキソ型のβ-1,3-グルカナーゼ，β-1,3-オリゴグルカンホスホリラーゼおよびラミナリビオースホスホリラーゼにより行われる(Fig. 2-15)[59]。

ラミナリビオースホスホリラーゼの研究は、最初に*E. gracilis*由来の酵素について行われた。Goldembergらは*E. gracilis* Zの菌体抽出液よりリン酸カルシウムゲルおよび陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを用いてラミナリビオースホスホリラーゼを240倍に精製した[57]。この報告の中でラミナリビオースホスホリラーゼはラミナリトリオース以上のオリゴ糖に対しても作用することおよび逆反応において各種のβ－グルコシドあるいはグルコシル二糖をアクセプターとして認識することが示された。また逆反応におけるグルコースによる基質阻害も報告された。Mannersらは、*A. ocellate*菌体抽出液にラミナリビオースホスホリラーゼ活性を発見し*E. gracilis*由来の酵素との比較を行った[58]。Marechalは、*E. gracilis* Z菌体抽出液からβ-1,3-オリゴグルカンホスホリラーゼ[EC 2.4.1.30]をラミナリビオースホスホリラーゼと分離、部分精製し[62]、その相違点について報告した[60]。両酵素ともラミナリビオース，ラミナリトリオース両者を加リン酸分解するが、ラミナリビオースホスホリラーゼは二糖をよく加リン酸分解しβ-1,3-オリゴグルカンホスホリラーゼは三糖をよく加リン酸分解することにより区別された。また、後者は活性にチオール化合物を要求するが前者は要求性がないことも報告された。

しかしながらラミナリビオースホスホリラーゼに関する研究はそれ以後ほとん

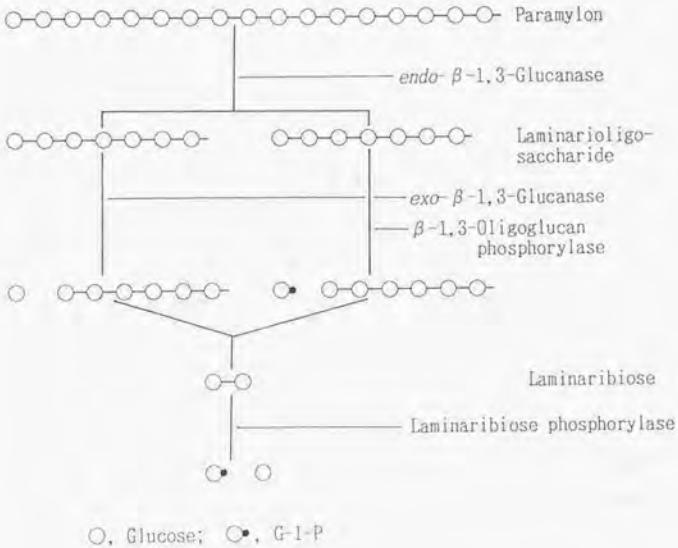


Fig. 2-15. Paramylon utilizing enzymes in *Euglena gracilis*.

ど報告されておらず、現在まで均一タンパクまでの精製は報告されていない。そのため、分子量などの蛋白化学的性質はほとんど未知である。今回の研究においては、*E. gracilis*由来のラミナリビオースホスホリラーゼを精製して蛋白化学的性質を調べるとともに反応速度解析を行い反応機構を決定することを目的とした。

Ⅱ-2-2.方法

試薬

ラミナリビオース，ラミナリトリオース，ラミナリテトラオース，ラミナリペンタオース，ラミナリヘキサオース，ラミナリヘプタオースは焼津水産化学工業（静岡）より購入した。その他の試薬は、試薬グレードの市販品を用いた。

培養

三種類の*Euglena*菌株，*E. gracilis* var. *bacillaris* (IAM E-2)，*E. gracilis* (IAM E-3)，*E. gracilis* Z (IAM E-6)は東京大学応用微生物研究所有用微生物保存施設藻株保存室より入手した。酵素源として*E. gracilis* Zを使用した。培養は5 g/lペプトン，2 g/l酵母エキス，10 μg/lシアノコバラミン，15 g/lグルコースからなる培地[95] 2 lを5 l三角フラスコ中に入れ、120 rpmの速度で暗黒下30℃において6日間回転振盪することにより行った。菌体は遠心分離により集菌した後蒸留水で一度洗浄した。

酵素精製

酵素精製の全段階は、4℃で行った。まず菌体350 g（10 lの培養液より集菌）を700 mlの10 mM トリス－塩酸緩衝液(pH 7.2)（緩衝液Ｃ）中に分散してBranson Ultrasonics社(Danbury, USA)製のmodel 250 sonifierを用いて超音波破砕を行った。遠心分離で得られた上清に30%飽和濃度になるまで硫酸アンモニウムを加えた。さらに遠心分離を行い沈澱を除いたものに30 gのセライト545（和光純薬，大阪）を加えてガラスフィルターで濾過を行った。濾液にButyl-Toyopearl 650M（東ソー）による疎水性カラムクロマトグラフィー(2.5 cm径×40 cm)を以下に示

す条件で行った。使用前に30%飽和濃度の硫酸アンモニウムを含む緩衝液Cで平衡化したカラムに濾液を通液し、さらに500 mlの30%飽和濃度の硫酸アンモニウムを含む緩衝液C及び1 lの20%飽和濃度硫酸アンモニウムを含む緩衝液Cで順次カラムを洗浄した。その後、緩衝液Cによる硫酸アンモニウム濃度20%～0%飽和の直線濃度勾配(2 l)を用いて酵素を溶出させた。活性のある画分を集め、得られた画分に硫酸アンモニウムを65%飽和濃度になるまで加えた。沈澱を遠心分離により集め50 mlの緩衝液Cに溶解したものを緩衝液Cに対して一晩透析を行った。

透析後、内液にDEAE-Toyopearl 650M（東ソー）による陰イオン交換カラムクロマトグラフィー(2.5 cm径×40 cm)を以下の条件で行った。緩衝液Cで平衡化されたカラムに透析内液を通液し、1 lの緩衝液Cで洗浄した。その後、酵素を2 lの緩衝液C中のNaClの直線濃度勾配(0～0.15 M)により溶出させた。活性画分を集めて、硫酸アンモニウムを20%飽和濃度になるまで加えたものを、2回目の疎水性クロマトグラフィーに供した。

2回目の疎水性クロマトグラフィーは、Butyl-Toyopearl 650Sを充塡したカラム(1.5 cm径×10 cm)を用いて行った。カラムは20%飽和濃度の硫酸アンモニウムを含む緩衝液Cで平衡化してから得られた酵素液を通液し、100 mlの20%硫酸アンモニウムを含んだ緩衝液Cで洗浄後、緩衝液Cによる硫酸アンモニウム濃度20%飽和～10%飽和の直線濃度勾配(200 ml)により酵素を溶出した。

得られた溶出液に対して、Toyopearl HW55F（東ソー）によるゲル濾過カラム(2.6 cm径×90 cm)を用いて、緩衝液Cを移動相として流速80 ml/hrの条件で分子サイズ分画を行った。

ゲル濾過から回収された活性画分は、以下の条件によるDEAE-Toyopearl 650S（東ソー）を用いた2回目の陰イオン交換カラムクロマトグラフィー(1 cm径×3 cm)により、電気泳動的に均一タンパクまで精製された。カラムは緩衝液Cで平衡化したものを用い、緩衝液Cによる0～0.1 Mあるいは0.05～0.15 MのNaClの直線的濃度勾配(50 ml)により酵素の溶出を行った。

測定法

タンパク質の定量は、Bradford法[76]により行った。G-1-Pの定量は、ホスホグルコムターゼ－グルコース－6－リン酸デヒドロゲナーゼ法により行った[77]。グ

ルコースの定量は、ムタロターゼを併用したグルコースオキシダーゼ－パーオキシダーゼ法[78]によりグルコースCテストワコーを用いて行った。Piの定量は、Lowry-Lopezの方法[79]により行った。酵素反応は、50 mMトリス－塩酸緩衝液(pH 7.2)（緩衝液D）中、30℃の条件で行った。加リン酸分解反応は、G-1-Pあるいはグルコースの増加を定量することにより、合成反応（逆反応）はPiの増加を定量することによりそれぞれ測定した。酵素活性は合成反応における2通りのアクセプターを用いて測定した。10 mM グルコース，10 mM G-1-Pの基質濃度からリン酸を遊離する活性を活性Ⅰ，10mM ラミナリビオース，10 mM G-1-Pからリン酸を遊離する活性を活性Ⅱと定義した。それぞれ上記の条件において1 μmol/minの速度でリン酸を遊離する酵素量を1 Uと定義した。

glucose + G-1-P → laminaribiose + Pi （活性Ⅰ） (2-32)

laminaribiose + G-1-P → laminaritriose + Pi （活性Ⅱ） (2-33)

電気泳動

3種類のポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）を、PhastSystemを用いて行った。Native-PAGEはDavisの方法[80]に準じて、PhastGel 8/25 (43×50×0.45 mm, Pharmacia-LKB)を用い、SDS-PAGEはLaemmliの方法[82]に準じて、PhastGel 10/15 (43×50×0.45 mm, Pharmacia-LKB)を用いて、IEF-PAGE（等電点電気泳動）は、PhastGel IEF 3-9 (43×50×0.35 mm, Pharmacia-LKB)を用いてそれぞれ行った。

ウエスタンブロッティング

電気泳動後のPhastGelからニトロセルロース膜(50×50 mm)へ、PhastSystemを用い、マニュアルに記載された方法に従って、電気的に転写を行った。膜上のラミナリビオースホスホリラーゼは、精製酵素に対するポリクローナル抗体と特異的に結合する蛋白バンドとして、アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗マウスIgGを含むImmun-Blot Assay Kit (Bio-Rad, Richmond, USA)を用いて検出した。精製酵素に対するポリクローナル抗体は、免疫生物研究所（藤岡）に依頼して、50 μgの抗原を用いてBALB/cマウスを免疫することにより調製した。

速度パラメータ

速度パラメータは、Clelandにより報告されている方法[83]を用いGauss-Newton法に従い最小自乗法を直接適用して計算した。計算はⅡ－1に記載したprogram 1～4を用いて行った。

Ⅱ-2-3.結果

Table 2-5. Summary of the purification of the laminaribiose phosphorylase

	Volume (ml)	Activity I(U)	Activity II(U)	Protein (mg)
Crude extract	890	1120	1726	7580
1st Butyl-Toyopearl				
E1	305	562	126	324
E2	450	43.5	373	277
1st DEAE-Toyopearl				
F0	90	33.3	4.0	20.5
F1	90	104	15.3	24.2
F2	90	124	16.2	20.3
2nd Butyl-Toyopearl				
F0	25	23.7	2.1	2.53
F1	25	89.3	9.0	4.45
F2	25	96.1	8.5	3.05
Toyopearl HW40F				
F0	31	15.1	1.7	0.50
F1	35	68.5	7.8	1.58
F2	35	79.9	8.5	1.58
2nd DEAE-Toyopearl				
F0	7	14.5	1.6	0.25
F1	10	53.2	6.0	0.94
F2	8	59.4	5.7	0.97

酵素精製

酵素の精製過程をTable 2-5に示した。Fig. 2-16に示すようにように1回目の

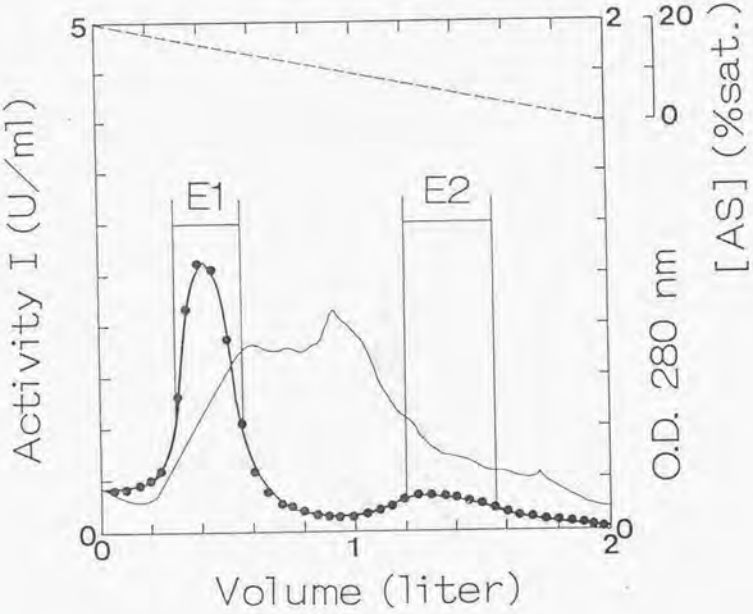


Fig. 2-16. The first hydrophobic chromatogram on the purification of laminaribiose phosphorylase.

The bold line with ● indicates activity I. The fine line does O.D. 280 nm. The broken line does concentration of ammonium sulfate.

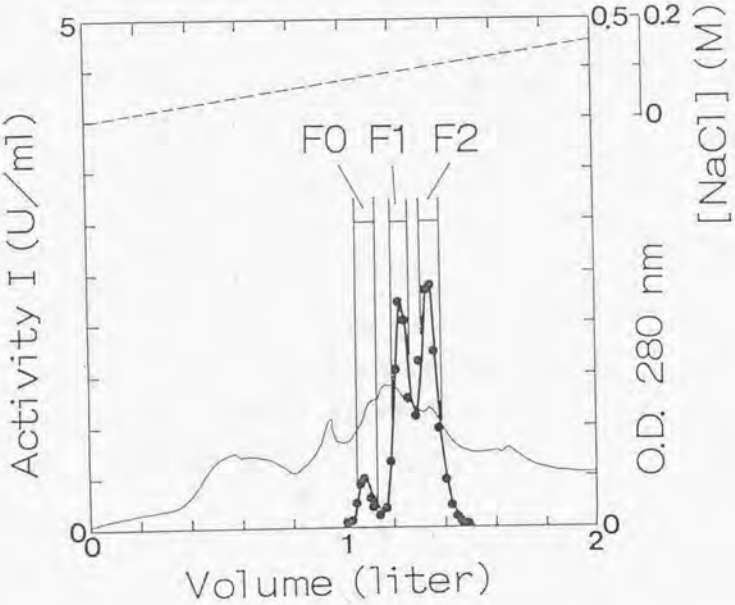


Fig. 2-17. The first anion exchange chromatogram on the purification of laminaribiose phosphorylase.

The bold line with ● indicates activity I. The fine line does O.D. 280 nm. The broken line does concentration of sodium chloride.

疎水性クロマトグラム上に二つの活性ピークが現れた。先に溶出されるものをＥ１，後に溶出されるものをＥ２と名付けた。Ｅ１，Ｅ２共に活性Ⅰ，Ⅱの両方とも持っていた。Ｅ１は活性Ⅰの方が活性Ⅱよりも強く、Ｅ２は逆に活性Ⅱの方が強かった。これは、Ｅ１がラミナリビオースホスホリラーゼ[EC 2.4.1.31]であり、Ｅ２がβ-1,3-オリゴグルカンホスホリラーゼ[EC 2.4.1.30]であることを示している。両酵素が両活性を持っていることは、すでに報告されている結論と一致している[60,61]。そこで、Ｅ１を次のステップにかけた。Fig. 2-17に示すように１回目の陰イオン交換クロマトグラム上に３つの活性ピークが出現した。それぞれ溶出順にＦ０，Ｆ１，Ｆ２と名付けた。Ｆ０の活性は、Ｆ１，Ｆ２に比べて小さかった。その後この３つの活性ピークを個別に均一蛋白まで精製した。なお２回目の陰イオン交換クロマトグラフィーのNaClの濃度勾配は、Ｆ０は0～0.1 Mを、Ｆ１およびＦ２は0.05～0.15 Mの条件を用いた。

３つの精製酵素は、native-PAGE上でそれぞれわずかに移動度の異なる単一の蛋白バンドを与えた(Fig.2-18)。SDS-PAGEにおいてもやはり単一のバンドを与えたが、この場合はそれぞれの移動度は全く同じであった。これらの分子量はSDS-PAGEで120 kDaと計算された。またこれら３蛋白はTSKgel G3000SWXLカラム（東ソー）を用いたゲル濾過（溶媒，0.1 M硫酸ナトリウムを含んだ0.1 Mリン酸緩衝液(pH 6.7)；流速，1 ml/min）においても分子量200 kDaを示す全く同じ保持時間を示した。ゲル濾過の結果とSDS-PAGEの結果は、これらの酵素が二量体構造をとっていることを示唆している。３者の等電点はそれぞれ4.90（Ｆ０），4.75（Ｆ１），4.65（Ｆ２）と決定された。３者のＮ末端アミノ酸配列は自動アミノ酸シーケンサーで決定することができず、Ｎ末端に何らかのブロックがかかっていることが示唆された。

基本的性質

３者の基本的性質をTable 2-6にまとめた。50 mMトリス－塩酸緩衝液(pH 6.4～8.2)中での反応最適pHはすべて7.2で同じであった。ＦＯおよびＦ２は40℃以下では安定であったが、Ｆ１の安定温度はこれらよりやや低く35℃以下であった。合成反応の反応初速度(基質初濃度：10 mMグルコース，10 mM G-1-P)は３者とも加リン酸分解反応(基質初濃度：10 mMラミナリビオース，10 mM Pi)の初速度の約４

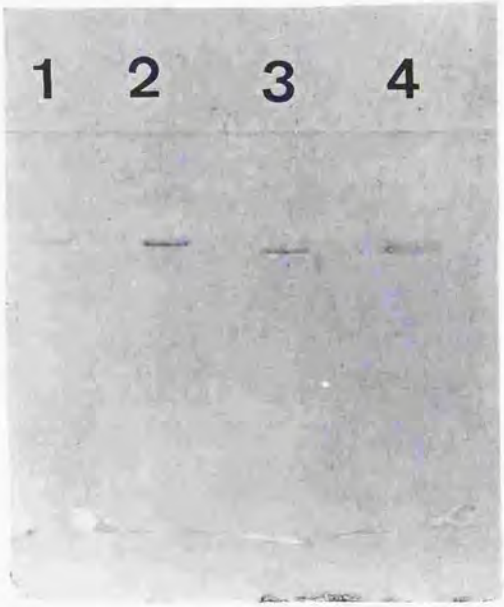


Fig. 2-18. Native-PAGE of the purified laminaribiose phosphorylases.

Lane 1, F0; Lane 2, F1; Lane 3, F2; Lane 4, mixtures of F0, F1 and F2.

倍であった。Table 2-6に示した通り、3者とも活性Ⅰ及びⅡを両方とも持っていた。酵素精製の後半部分で、3者それぞれの活性Ⅰと活性Ⅱの比は本質的に変化していないことから、活性Ⅱはβ-1,3-オリゴグルカンホスホリラーゼが混在しているためではないことが示唆された。

Table 2-6. Basic properties of the three purified laminaribiose phosphorylase

	F0	F1	F2
Molecular mass			
SDS-PAGE (kDa)	120	120	120
Gel filtration (kDa)	200	200	200
Isoelectric point (pI)	4.90	4.75	4.65
Specific activity			
Activity I (U/mg)	54	59	71
Activity II (U/mg)	6.6	6.9	6.8
Phosphorolysis[a] (U/mg)	13	15	17
Optimum pH	7.2	7.2	7.2
Thermal stability[b]			
at 35°C	101	99	99
at 40°C	96	77	103
at 45°C	72	20	73

[a]Assayed with the following concentration of the substrates; 10 mM laminaribiose and 10 mM Pi.
[b]Persentage of activity I remaining after incubating the enzyme for 30 min in buffer D at the temperature indicated.

免疫学的性質

F1, F2に対する抗体をマウスより作成した。F1とF2はオクテロニー二重拡散法[38]において抗F1, 抗F2両抗体に対して完全に融合した沈降線を形成した(Fig. 2-19, A)。また、F0もF1およびF2と抗F1に対して完全に融合した沈降線を形成した(Fig. 2-19, B)。この結果は、これら3者が免疫学的には区別できないことを示している。また、抗F1及び抗F2抗体のβ-1,3-オリゴグルカンホスホリラーゼに対する反応性をオクテロニー法で調べた結果、沈降線の形成は確認できなかったため、ラミナリビオースホスホリラーゼとβ-1,3-オリゴ

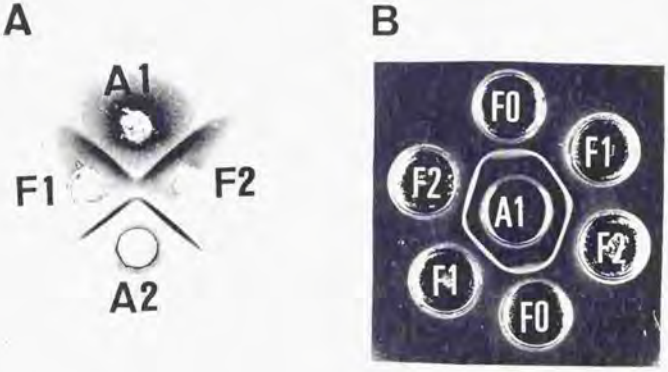


Fig. 2-19. Ouchterlony's double diffusion test on F0, F1, F2.

A, F1 and F2 against anti-F1 and anti-F2; B, F0, F1 and F2 against anti-F1. The gel of A was stained with Coomassie brilliant blue R-250 after drying. The gel of B was not stained. A1 and A2 mean anti-F1 and anti-F2, respectively.

ゲルカンホスホリラーゼは免疫学的に全く異なる蛋白であることが判明した。

ほかの*E. gracilis*の株にラミナリビオースホスホリラーゼの多型性が見られるかを調べるために、*E. gracilis* var. *bacilaris* (IAM E-2)および*E. gracilis* (IAM E-3)を用いてウエスタンブロットアッセイを行った。これら3株を径18 mmの試験管中5 mlの培地でⅡ-2-2に記載した条件で培養した。集菌した菌体を1 mlの緩衝液C中で超音波破砕処理を行い、上清を電気泳動に供した。結果をFig. 2-20に示す。SDS-PAGEの場合は、3株とも移動度の同じ単一の抗F1と結合するバンドを示した。Native-PAGEの場合には、*E. gracilis* Zのみ多型性を示し、ほかの2株は移動度がF0と同じである単一のバンドしか示さなかった。この結果はSasakiらの方法[53]に従って行ったゲルの活性染色により得られるものと一致した。

基質特異性

以後の実験は、F0の量が不十分なためF1, F2に対してのみ行った。重合度2～7のラミナリオリゴ糖の加リン酸分解反応の速度を10 mM ラミナリオリゴ糖, 10 mM Piの条件で求めた。Table 2-7に示すように、両者ともすべてのラミナリオリゴ糖を分解したが、ラミナリビオースの分解速度に比べて、3糖以上のオリゴ糖の分解速度は遅かった。F1, F2の各オリゴ糖に対する特異性に差はみられなかった。

Table 2-7. Initial rates on phosphorolysis of laminarioligosaccharides

	F1	F2
Laminaribiose	100	100
Laminaritriose	12	12
Laminaritetraose	14	13
Laminaripentaose	7	8
Laminarihexaose	5	6
Laminariheptaose	5	7

Values of laminaribiose is defined as 100.

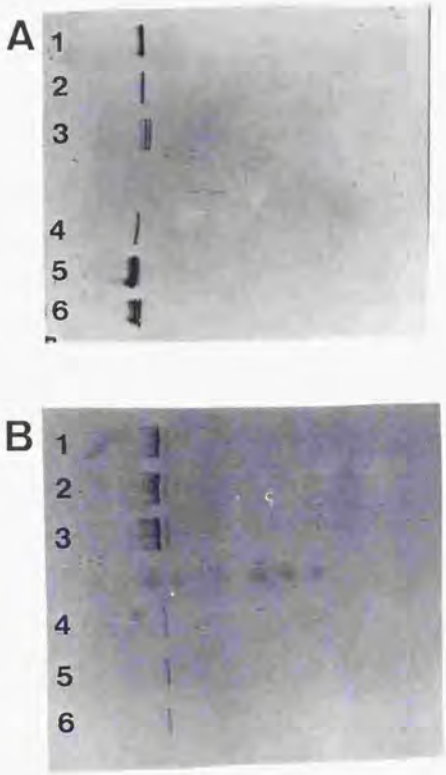


Fig. 2-20. Western blot assay on the three strains of *E. gracilis*.

A. Native-PAGE. Lane 1 and 4, *E gracilis* var. *bacillaris* (IAM E-2), 1 μl and 0.1 μl; Lane 2 and 5, *E. gracilis* (IAM E-3), 0.1 μl and 1 μl; *E. gracilis* Z (IAM E-6), 0.1 μl and 1 μl; respectively.
B. SDS-PAGE, Lane 1 and 4, *E gracilis* var. *bacillaris* (IAM E-2), 1 μl and 0.1 μl; Lane 2 and 5, *E. gracilis* (IAM E-3), 1 μl and 0.1 μl; *E. gracilis* Z (IAM E-6), 1 μl and 0.1 μl; respectively.
After blotting, proteins were immuno stained with antiserum raised against F1.

次に合成反応におけるグルコシルアクセプターの特異性を10 mM G-1-P, 10 mM アクセプターの条件で調べた。

Table 2-8. Substrate specificity for the glucosyl acceptor of the laminaribiose phosphorylase

	F1	F2
D-Glucose	100	100
D-Mannose	1.1	1.5
D-Allose	0	0
D-Galactose	0.5	0.4
L-Idose	0	0
α-Methyl-D-glucoside	0	0
β-Methyl-D-glucoside	16	14
1,5-Anhydro-D-glucitol	40	35
2-Deoxy-D-Glucose	8.5	8.0
D-Glucosamine	2.3	2.0
N-Acetyl-D-glucosamine	0	0
6-Deoxy-D-glucose	0	0
5a-Carba-α-DL-glucopyranose	0	0
5a-Carba-β-DL-glucopyranose	0	0
D-Xylose	0.6	0.5
D-Lyxose	0	0
D-Ribose	0	0
L-Arabinose	0	0
D-Fructose	0	0
L-Sorbose	0	0
D-Sophorose	1.7	1.6
D-Laminaribiose	11	10
D-Cellobiose	18	16
D-Gentiobiose	1.2	1.2
Sucrose	0	0
Phenyl-β-D-glucoside	74	85
o-Nitrophenyl-β-D-glucoside	10	10
m-Nitrophenyl-β-D-glucoside	35	37
p-Nitrophenyl-β-D-glucoside	22	26
Salicine	60	61

Value of glucose is defined as 100.

Table 2-8に示すようにこの場合もＦ１，Ｆ２間に差はみられなかった。グルコースが最も良いアクセプターであった。D-グルコースのＣ３，Ｃ４，Ｃ５のエピマーであるD-アロース，D-ガラクトース，L-イドースはアクセプターとして作用しなかった。Ｃ２の誘導体の中には弱いながらアクセプター活性を持つものがあった（D-マンノース，2-デオキシ-D-グルコース，D-グルコサミン）。Ｃ６の誘導体では、D-キシロースはわずかにアクセプターとして作用したが、6-デオキシ-D-グルコースは作用しなかった。1,5-アンヒドロ-D-グルシトールは、グルコースに比べて35%～40%の活性を示した。このことは、アノメリック水酸基は酵素反応に重要ではないことを示しており、Ⅱ－１に示したセロビオースホスホリラーゼの結果と異なっている。5a-Carba-α-およびβ-グルコピラノースは基質として作用しなかった。この点においてもセロビオースホスホリラーゼとは異なっている。

各種のβ-グルコシドおよびβ-グルコ二糖はアクセプターとして作用した。フェニル-β-グルコシドが最も高い活性を示した。またすべてのβ-グルコ二糖がアクセプターとして作用した。セロビオースとラミナリビオースは、ソホロースとゲンチオビオースに比べて約10倍の活性を示した。興味深いことにセロビオースは酵素の天然の基質と思われるラミナリビオースよりも高いアクセプター活性を示した。α-メチルグルコシドやスクロースのようなα-グルコシドはアクセプターとして作用しなかった。

反応機構

Ｆ１，Ｆ２の反応機構は加リン酸分解反応を用いて決定された。リン酸濃度を何点かに固定しラミナリビオース濃度の逆数に対して反応初速度の逆数をプロットしたところ、両者とも一点で交わる線群が得られた(Fig. 2-21)。この結果は、Ｆ１，Ｆ２ともに反応機構がsequential機構であることを示している。

さらに詳しく解析するために、生成物による阻害パターンを調べた。Table 2-9に示した結果は、Ｆ１，Ｆ２ともに以下に示すordered bi bi機構で反応を行っていることを示している。

$$E + A \rightleftharpoons E\text{-}A \qquad (2\text{-}34)$$

$$E\text{-}A + B \rightleftharpoons E\text{-}AB \qquad (2\text{-}35)$$

$$(E\text{-}AB \rightleftharpoons E\text{-}QP) \qquad (2\text{-}36)$$

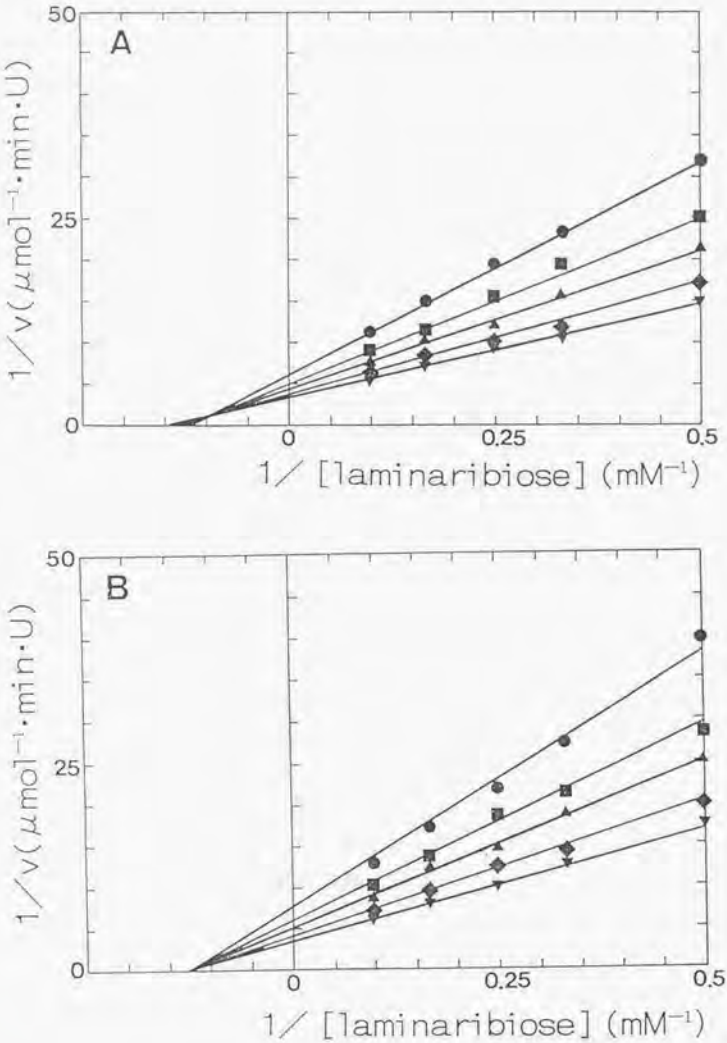


Fig. 2-21. The 1/v-1/[laminaribiose] plot on the phosphorolytic reaction of laminaribiose phosphorylase.

A, F1; B, F2. The initial concentration of Pi are: ●, 0.1 mM; ■, 0.15 mM; ▲, 0.2 mM; ◆, 0.3 mM; ▼, 0.5 mM. Lines are theoretical ones.

$$E\text{-}QP \rightleftharpoons E\text{-}Q + P \tag{2-37}$$

$$E\text{-}Q \rightleftharpoons E + Q \tag{2-38}$$

(A, ラミナリビオース；B, Pi；P, グルコース；Q, G-1-P)

Table 2-9. Inhibition pattern of the product of laminaribiose phosphorylase

	Against laminaribiose		Against Pi	
	F1	F2	F1	F2
G-1-P	C	C	NC	NC
Glucose	NC	NC	NC	NC

The inhibition against laminaribiose was examined with 0.5 mM Pi.
That against Pi was done with 5 mM laminaribiose.
C and NC mean competitive and non-conpetitive, respectively.

反応初速度式は以下のように示される。

$$v = \frac{V_{max}[A][B]}{K_{iA}K_{mB} + K_{mB}[A] + K_{mA}[B] + [A][B]} \tag{2-39}$$

速度パラメータは、プログラム3を用いてF1，F2に対してそれぞれ次のように計算された。

F1：V_{max}=0.43 μmol/min·U, K_{iA}=9.7 mM, K_{mA}=6.7 mM, K_{mB}=0.16 mM

F2：V_{max}=0.44 μmol/min·U, K_{iA}=8.1 mM, K_{mA}=8.2 mM, K_{mB}=0.23 mM

Fig. 2-21に示した通り、計算結果は実測値とよく一致した。

拮抗基質阻害

合成反応において、Fig. 2-22に示すようにグルコースによる基質阻害現象が観測された。この現象は、セロビオースホスホリラーゼの場合と同じく拮抗基質阻害として説明できる。この現象は、ordered bi bi機構の化学式に以下の二式を加えることによって説明される。

$$E + P \rightleftharpoons E\text{-}P \tag{2-40}$$

$$E\text{-}P + P \rightleftharpoons E\text{-}PP \tag{2-41}$$

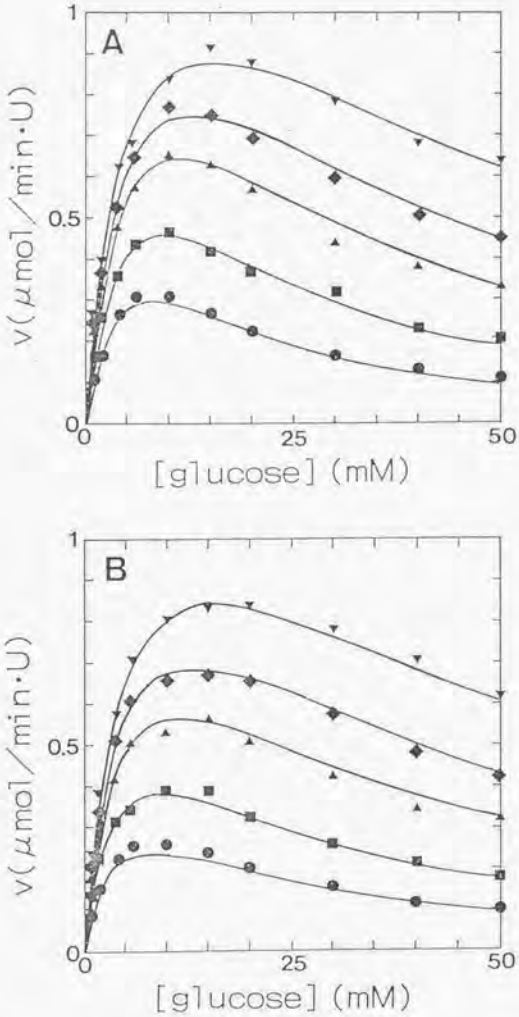


Fig. 2-22. The v-[Glc] plot on the synthetic reaction of laminaribiose phosphorylase.

A, F1; B, F2. The initial concentration of G-1-P are: ●, 0.25 mM; ■, 0.5 mM; ▲, 1 mM; ◆, 1.5 mM; ▼, 2.5 mM. Lines are thoretical ones.

拮抗基質阻害において、反応速度式は以下のように現される。

$$v = V_{max}[Q][P]/(a+b[P]-c[Q]+[Q][P]+d[P]^2+e[P]^3) \quad (2\text{-}42)$$

(P, Glc; Q, G-1-P)

F1, F2について(a, b, c, d, e)はそれぞれ(1.7, 0.33, 5.0, 4.3×10^{-2}, 5.0×10^{-4})および(2.0, 0.72, 5.8, 4.8×10^{-2}, 4.7×10^{-4})と計算され、V_{max}はそれぞれ1.6, 1.7 μmol/min・Uであった。計算値より求めた曲線は、Fig. 2-22に示したように実測値と良い一致を示した。

(2-42)式はII－1に示した通り(2-43)式の速度パラメータを簡略に表したものである。

$$v=\frac{V_{max}[Q][P]}{K_{iQ}K_{mP}+(K_{mQ}+\frac{K_{iQ}K_{mP}}{K_{I1}})[P]+K_{mP}[Q]+[Q][P]+(\frac{K_{iQ}K_{mP}}{K_{I1}K_{I2}}+\frac{K_{mQ}}{K_{I1}})[P]^2+\frac{K_{mQ}}{K_{I1}K_{I2}}[P]^3} \quad (2\text{-}43)$$

ここで各速度パラメータを(a, b, c, d, e)から計算すると次のようになった。

F1 : K_{iQ}=0.30 mM, K_{mQ}=0.021 mM, K_{mP}=5.0 mM, K_{I1}=5.5 mM, K_{I2}=7.9 mM

F2 : K_{iQ}=0.34 mM, K_{mQ}=0.56 mM, K_{mP}=5.8 mM, K_{I1}=12 mM, K_{I2}=100 mM

II-2-4.考察

本研究は、ラミナリビオースホスホリラーゼの均一タンパクまでの精製に成功した最初の報告である。*E. gracilis* Zの菌体抽出液から等電点のわずかに異なる3種のラミナリビオースホスホリラーゼが精製された。これら3種類の基質特異性などの性質はほとんど同じであった。ラミナリビオースホスホリラーゼの多型性は現在まで報告されていない。Goldembergらは今回用いた菌株と同一の株とされる*E. gracilis* Zのラミナリビオースホスホリラーゼの部分精製に関して報告しているが[57]、多型性については報告していない。しかしながらこの報告中でも酵素の精製に陰イオン交換クロマトグラフィーが使われていることから、Goldembergらが用いた菌株は多型性を示さないと考えられる。今回他の*E. gracilis*株に関して酵素の多型性を精製酵素に対するポリクローナル抗体を用いて調べた結果、他の二株は*E. gracilis* Zのマイナー画分F0に相当するただ一つの酵素しか持っ

ていないことが判明した。この結果は、今回用いた株のラミナリビオースホスホリラーゼの多型性が、遺伝子の相違でなく発現後の修飾による可能性のあることを示唆している。今回の研究においては、3株しか確認していないので、ラミナリビオースホスホリラーゼの多型性が、*E. gracilis* Z (IAM-E6)に特徴的な現象であるか、それとも他の株でも比較的普遍的にみられる現象であるかは今後の研究課題である。

ラミナリビオースホスホリラーゼのアクセプター特異性を系統的に調べた結果、本酵素はアクセプターのアノメリック水酸基を余り認識していないことが示された。この点はβ－アノメリック水酸基を認識するセロビオースホスホリラーゼ（Ⅱ－1），α－アノメリック水酸基を認識するマルトースホスホリラーゼ[34]とは異なっていた。

ラミナリビオースホスホリラーゼの反応機構はセロビオースホスホリラーゼの場合と同じくordered bi bi機構であると決定された。この結果により反転型の二糖類加リン酸分解酵素4種中3つまでがsequential機構で反応が行われていることが示されたことになる。トレハロースホスホリラーゼのみ反応機構が決定されていない。

逆反応においてグルコースによる拮抗基質阻害現象が観測された。この現象はセロビオースホスホリラーゼと同じモデル(Fig. 2-14)を用いて解釈することができた。F1，F2に対して速度パラメータを計算したところK_{mG}，K_{i1}，K_{i2}の値に違いが生じた。しかしながらFig. 2-22に示すように両者のv-[Glc]曲線にはほとんど差が見られない。この数値の違いは酵素間の違いが原因ではなく(2-42)式のbの値の計算値の誤差に起因すると考えられる。bはグルコース濃度が無限小の時のG-1-Pに対するK_m*app*に相当するパラメータである。F1，F2ともにbの値は1 mM以下に計算された。しかしながら測定感度の問題で今回用いた方法では基質濃度が1 mM以下の反応初速度を正確に測定することは難しい。そのため基質濃度が十分に低い領域での速度解析が行えなかったためbの値に誤差が生じたものと考えられる。感度の高い反応初速度の測定法がより正確なパラメータ計算に必要であり今後の課題である。

Ⅱ－3．二糖類加リン酸分解酵素の精製と諸性質に関する考察

本研究において、セロビオースホスホリラーゼ及びラミナリビオースホスホリラーゼの反応機構が両者ともsequential型の一種であるordered型であることを明らかにした。また、セロビオースホスホリラーゼがリン酸の非存在下でセロビースと[*U*-^{14}C]グルコースとの交換反応を示さないことを証明した。これにより5種類知られている二糖類加リン酸分解酵素の反応機構は4種類まで解明されたことになる。結果をTable 2-10にまとめた。

Table 2-10. Disaccharide phosphorylases

Name of the enzyme	Configuration	Isotope exchange	Mechanism
Sucrose phosphorylase	retention	yes	ping pong
Maltose phosphorylase	inversion	no	sequential
Cellobiose phosphorylase	inversion	no[a]	sequential[a] (ordered)
Laminaribiose phosphorylase	inversion	no	sequential[a] (ordered)
Trehalose phosphorylase	inversion	unknown	unknown

[a]This study.

保持型の酵素は、スクロースホスホリラーゼ一つのみしられている。スクロースホスホリラーゼは、*Pseudomonas saccharophila*由来のもの[14, 27]は二量体構造であり、*Leuconostoc mesenteroides*[23]および*Streptococcus mutans*[21]由来のものは単量体構造であると報告されており、構造の違いが示唆されている。*P. saccharophila*[23]および*L. mesenteroides*[26]由来の酵素は、速度パラメータの値に大きな違いがみられるが、反応機構は両者ともping pong bi biであると決定された。

反転型酵素についてはマルトースホスホリラーゼがsequential型の反応機構をとることのみ知られていた[30]。本研究によりセロビオースホスホリラーゼ，ラミナリビオースホスホリラーゼ両者の反応機構が決定された。これにより4種の反

転型の二糖類加リン酸分解酵素のうち３つまでがsequential型の反応機構をとることが示された。残る一つの酵素であるトレハロースホスホリラーゼはまだ反応機構は明らかにされていない。

二糖類加リン酸分解酵素は、切断されるグルコシドのアノマー型，生成するグルコース－１－リン酸のアノマー型および反応前後のアノマー型の保持または反転により分類することが可能である[26]。反応機構の種類とアノマー反転の有無との間には相関があると考えられる。すなわち現在まで反応機構が解明された二糖類加リン酸分解酵素は例外なく保持型のものはping pong機構であり、反転型のものはsequential機構である。

ところで加リン酸分解酵素と加水分解酵素の触媒する反応を比較すると、グリコシド切断時にソルボリシスの基質としてリン酸または水が使われる違いはあるが、本質的には非常に良く似た反応を触媒する。また、加リン酸分解酵素，加水分解酵素の両者とも反応の前後にアノマー型の保持されるものおよび反転されるものが存在し、この点においても両酵素は類似している。

保持型酵素反応機構のモデルとして加水分解酵素においてはFig. 2-23に示す三種類の仮説が提案されている[1,73,99]。Ａのモデルは二回のS_N2反応によるいわゆる二重置換反応と呼ばれるものである。このモデルにおいては反応中間体として反転したアノマー型の共有結合を持った酵素－グリコシル複合体を形成する。Ｂのモデルは一回のS_N1反応による方向特異的な置換反応である。この場合は求核試薬は酵素の立体構造により定まった方向からしか攻撃できないために反応前後のアノマー型は正確に保持される。この機構においては反応中間体としてカルボニウムイオンを経る。この場合は反応中間体の酵素－カルボニウムイオンの間に共有結合は生じない。Ｃのモデルは一回のS_N2反応によるfront displacementモデルである。加水分解酵素と加リン酸分解酵素の類似性からこのような反応機構モデルは加リン酸分解酵素にも適用できると考えられる。

スクロースホスホリラーゼでは酵素の断片とβ結合したグルコースが単離されており、反応中間体としてβ－グルコシル－酵素複合体の存在が示唆された[17,27]。この結果はスクロースホスホリラーゼの加リン酸分解反応がＡのモデルに従っていることを支持している。しかしながら反応中間体の直接的な検出は行われていないので、Ｂのモデルの可能性も残されている。どちらのモデルに従い反応

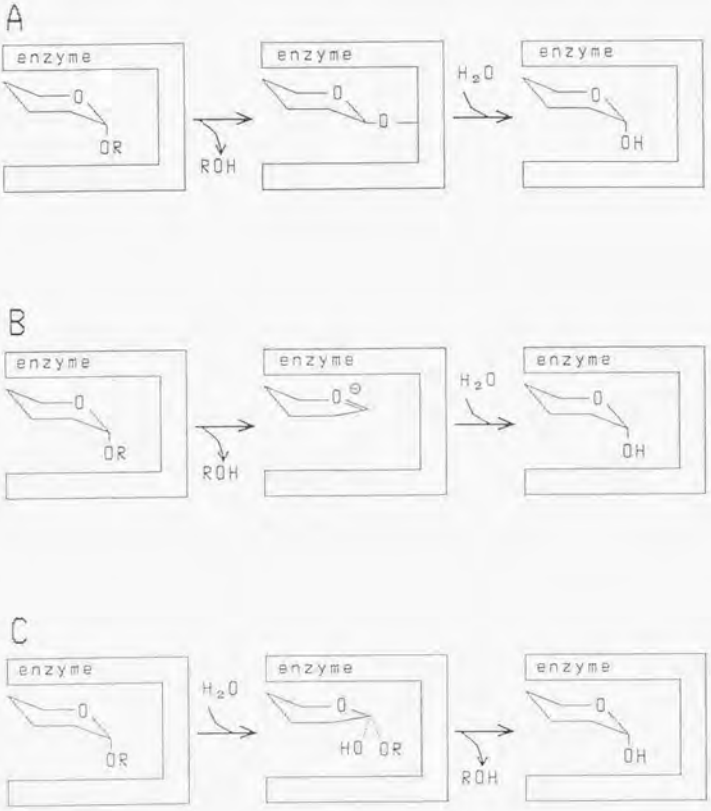


Fig. 2-23. Proposed mechanisms of the anomeric retention.

A, Double S_N2 (double displacement); B, S_N1 (carbonium ion); C, Front side displacement by S_N2.

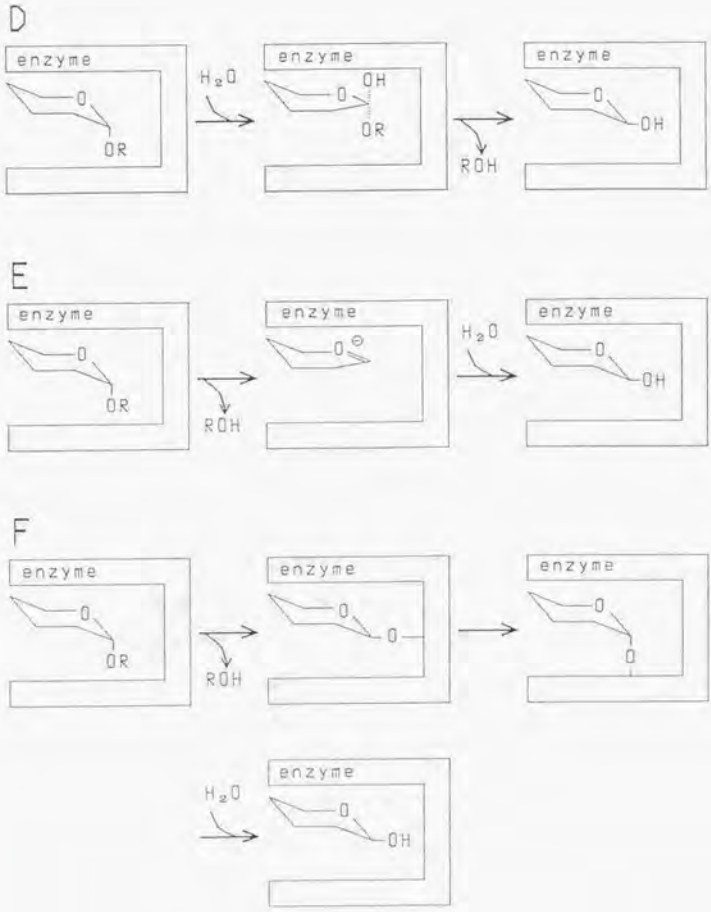


Fig. 2-24. Proposed mechanism of the anomeric inversion.

D, S_N2 (single displacement); E, S_N1 (carbonium ion); F, Triple S_N2.

が進行しているかを確定させるためには、反応中間体を何らかの方法で直接とらえる研究が必要になる。なおCのモデルで反応が進行している場合には反応機構がsequential型になる。そのためこのモデルはスクロースホスホリラーゼの反応モデルとは考えられない。

反転型酵素の反応機構について加水分解酵素においてはFig. 2-24に示した三種類の仮説が提案されている[1,73,99]。Dのモデルは一回のS_N2反応によるものでありいわゆる一重置換反応とよばれるものである。Eのモデルは一回のS_N1反応による方向特異的置換によるものである。この経路では反応中間体としてカルボニウムイオンを経る。Fのモデルは三回のS_N2反応によるものである。

反転型の二糖類加リン酸分解酵素はすべてsequential型の反応機構をとる。ここで、E，Fのモデルにおいては第二の基質が酵素に結合する前に第一の生成物が酵素から離脱することになり、単純に考えれば反応機構はping pong型になる。そのためE，Fがこれらの酵素のモデルになるとは考え難い。Dのモデルは反応機構のsequential型を説明しやすいため、反転型二糖類加リン酸分解酵素のモデルとして考えやすい。

加水分解酵素では反応機構の解析が困難なため反応機構のモデルとしてどれが妥当であるかを検討することが困難であったが、加リン酸分解酵素においては以上のように各モデルの妥当性を検討できた。

ところで、加水分解酵素において、例えばα－グルコシダーゼとグルコアミラーゼあるいは保持型と反転型のβ－キシロシダーゼなどについて、保持型の酵素には糖転移活性の強いものが多く報告されているが反転型の酵素について明確に逆反応と区別した糖転移反応は確認されていない[1,73-75]。二糖類加リン酸分解酵素の反応機構は保持型がping pong型であり反転型がsequential型であることから、以下にこの反応機構が加水分解酵素でも同様であると仮定して反転型の加水分解酵素がほとんど糖転移反応を行わないことについて考察を行う。

まず、糖転移反応は(2-44)式で示される。

$$\text{glycosyl-R} + \text{R'} \rightarrow \text{glycosyl-R'} + \text{R} \qquad (2\text{-}44)$$

反応機構がping pong型の場合の加水分解および糖転移反応の反応素過程を以下に示す。

$$\text{E} + \text{glycosyl-R} \rightleftharpoons \text{E-glycosyl-R} \qquad (2\text{-}45)$$

$$\text{E-glycosyl-R} \rightleftharpoons \text{E-glycosyl} + \text{R} \quad (2\text{-}46)$$

$$\text{E-glycosyl} + H_2O \rightleftharpoons \text{E-glycosyl-}H_2O \quad (2\text{-}47)$$

$$\text{E-glycosyl-}H_2O \rightleftharpoons \text{E} + \text{glycosyl-}H_2O \quad (2\text{-}48)$$

$$\text{E-glycosyl} + \text{R}' \rightleftharpoons \text{E-glycosyl-R}' \quad (2\text{-}49)$$

$$\text{E-glycosyl-R}' \rightleftharpoons \text{E} + \text{glycosyl-R}' \quad (2\text{-}50)$$

(2-45)～(2-48)の過程で反応が起これば加水分解になる。ここで(2-47)は左辺のH_2Oが常に大過剰に存在しているために事実上右向きの不可逆反応になる。糖転移反応は(2-45)→(2-46)→(2-49)→(2-50)の順序で反応が行われる。そのため加水分解反応と糖転移反応との関係は(2-47)と(2-49)との競争反応で説明される。

反応機構がsequential型の場合は以下のようになる。

$$\text{E} + \text{glycosyl-R} \rightleftharpoons \text{E-glycosyl-R} \quad (2\text{-}51)$$

$$\text{E-glycosyl-R} + H_2O \rightleftharpoons \text{E-glycosyl-R-}H_2O \quad (2\text{-}52)$$

$$\text{E-glycosyl-R-}H_2O \rightleftharpoons \text{E-glycosyl-}H_2O + \text{R} \quad (2\text{-}53)$$

$$\text{E-glycosyl-}H_2O \rightleftharpoons \text{E} + \text{glycosyl-}H_2O \quad (2\text{-}54)$$

$$\text{E-glycosyl-}H_2O + \text{R}' \rightleftharpoons \text{E-glycosyl-R}'\text{-}H_2O \quad (2\text{-}55)$$

$$\text{E-glycosyl-R}'\text{-}H_2O \rightleftharpoons \text{E-glycosyl-R}' + H_2O \quad (2\text{-}56)$$

$$\text{E-glycosyl-R}' \rightleftharpoons \text{E} + \text{glycosyl-R}' \quad (2\text{-}57)$$

この場合(2-51)～(2-54)の過程で反応が起これば加水分解になる。なお(2-52)は左辺のH_2Oが常に大過剰に存在しているために事実上右向きの不可逆反応になる。糖転移反応が起こるためには(2-51)～(2-53)→(2-55)～(2-57)の順序で反応が起こる必要がある。ここで(2-56)右辺のH_2Oが大過剰に存在するために事実上左向きの不可逆反応になる。転移反応が起こるためには(2-56)が右向きに進行する必要があるため、この反応機構においては糖転移反応が起こらないことになる。

このように二糖類加リン酸分解酵素で得られたアノマー反転と反応機構の関係を加水分解反応酵素に適用すれば、転移反応とアノマー反転の有無との関係について説明が可能になる。このように二糖類加リン酸分解酵素反応機構の解析は加水分解酵素の反応機構について意義のある考察を与えることを示した。ここに示した考察の信頼性を上げるには、未だ未知であるトレハロースホスホリラーゼの反応機構の決定を行い二糖類加リン酸分解酵素すべての反応機構を決定する研究が必要であろう。

Ⅱ－4．要約

*Cellvibrio gilvus*菌体抽出液よりセロビオースホスホリラーゼを精製した。精製酵素の比活性は145倍上昇して41.8 U/mgとなった。分子量はゲル濾過法で180 kDa，SDS-PAGEで85 kDaと決定され、二量体構造が示唆された。等電点はpH 6.0と決定された。

本酵素はリン酸の非存在下においてセロビオースと[U-^{14}C]グルコース間の交換反応を示さなかった。また反応初速度解析により本酵素の反応機構はordered bi bi 機構であることが示された。加リン酸分解反応の速度パラメータはK_{mA}=2.6 mM，K_{mB}=0.61 mM，K_{iA}=6.8 mM，V_{max}=1.43 μmol/min·Uと計算された。

本酵素の逆反応においてアクセプターの特異性を検討し、グルコース以外にマンノース，グルコサミン，2-デオキシグルコース，6-デオキシグルコース，キシロースなどのグルコースの2位および6位の誘導体がアクセプターになり得ることを見いだした。これらのうち6-デオキシグルコースがグルコースに次いで反応性が高かった。

本酵素はアクセプターとしてβ－グルコースをα－グルコースよりもよく利用した。α－グルコースの反応性を調べるために疑似糖を用いた実験を行った。その結果，本酵素はアクセプターとして5a-carba-β-glucopyranoseを利用するが、5a-carba-α-glucopyranoseは全く基質にしなかった。1,5-アンヒドログルシトールがアクセプターとならないことと併せて、本酵素はβ－グルコースのみを認識しているものと結論した。

グルコース，グルコサミン，6-デオキシグルコースをアクセプターとして用いたときに基質阻害現象がみられ、グルコースの場合が最も顕著であった。この現象は基質の一つであるグルコースがもう一方の基質であるG-1-Pを拮抗的に阻害する拮抗基質阻害現象であることを明らかにした。この場合反応速度式は次のように表される。

$$v=V_{max}[Q][P]/(a+b[P]+c[Q]+[Q][P]+d[P]^2+e[P]^3) \qquad (2\text{-}44)$$

(P，グルコース；Q，G-1-P)

各係数の値は次のように計算された。

(a, b, c, d, e, V_{max})=(1.41, 1.99, 2.83, 1.43×10^{-2}, 3.90×10^{-3}, 2.07)

Euglena gracilis Z菌体抽出液よりラミナリビオースホスホリラーゼとして、Native-PAGEで移動度のわずかに異なる三つのタンパク、ＦＯ，Ｆ１，Ｆ２を精製した。酵素タンパクの存在量は、ＦＯが少なくＦ１，Ｆ２はほぼ同量含まれていた。比活性はそれぞれ54 U/mg, 59 U/mg, 71 U/mgであった。これらのタンパクは、ゲル濾過，SDS-PAGEで全く区別ができなかった。分子量はそれぞれの方法で200 kDa, 120 kDaと計算され、二量体構造が示唆された。等電点はわずかに異なりそれぞれ4.90, 4.75, 4.65であった。

Ｆ１，Ｆ２に対する抗体を調製して免疫的性質を調べた結果ＦＯ，Ｆ１，Ｆ２は免疫的に区別できないことが示された。*E. gracilis*の他の菌株についてラミナリビオースホスホリラーゼの存在形態を調べたところ他の２株ではNative-PAGEでＦＯに相当するタンパクのみ存在することを明らかにした。

Ｆ１，Ｆ２は重合度７までのすべてのラミナリオリゴ糖を加リン酸分解した。また逆反応においてアクセプターとしてグルコース以外に各種β－グルコシド，β－グルコシル二糖，1,5-アンヒドログルシトールなどを認識した。Ｆ１，Ｆ２間に基質特異性の違いは見られなかった。

Ｆ１，Ｆ２の反応機構はordered bi bi機構であり、セロビオースホスホリラーゼと同じであった。速度パラメータ(K_{mA}, K_{mB}, K_{iA}, V_{max})はそれぞれ(6.7 mM, 0.16 mM, 9.7 mM, 0.43 μmol/min·U), (8.2 mM, 0.23 mM, 8.1 mM, 0.44 μmol/min·U)と計算された。

Ｆ１，Ｆ２は逆反応においてグルコースによる基質阻害が観測された。この現象はセロビオースホスホリラーゼにおける拮抗基質阻害と同じ現象と考えられた。速度パラメータ(a, b, c, d, e, V_{max})はそれぞれ(1.7, 0.33, 5.0, 4.3×10^{-2}, 5.0×10^{-4}), (2.0, 0.72, 5.8, 4.8×10^{-2}, 4.7×10^{-4})と計算された。

本研究の結果、５種の二糖類加リン酸分解酵素のうち４種までその反応機構が明らかになった。その結果，アノマー型保持型酵素はping pong機構で反応が起こり、反転型酵素はsequential機構で反応が起こることが示唆された。

第Ⅲ章．二糖類加リン酸分解酵素の利用に関する研究

Ⅲ－1．固定化セロビオースホスホリラーゼを用いたglucosyl-xyloseの合成

Ⅲ-1-1．序

セロビオースホスホリラーゼは(3-1)式のセロビオースの可逆的加リン酸分解を触媒する酵素であるが、その逆反応においてアクセプター分子に対する基質特異性はTable 2-2に示したように必ずしも厳密ではない。これは(3-2)式の方法によるヘテロ二糖の合成の可能性を示唆するものである。

G-1-P + Glc ⇌ Glc-Glc (cellobiose) + Pi (3-1)

G-1-P + Acceptor ⇌ Glc-Acceptor + Pi (3-2)

Alexanderらは*Clostridium thermocellum*由来のセロビオースホスホリラーゼ部分精製標品を用いたさまざまなヘテロ二糖の合成を報告している[51]。

近年各種のオリゴ糖の機能性食品としての使用が注目されている。そこで本研究では*Cellvibrio gilvus*由来のセロビオースホスホリラーゼを用いたヘテロ二糖の効率的合成を試みた。精製酵素の基質特異性(Table 2-2)から*C. gilvus*セロビオースホスホリラーゼは、グルコースの2位あるいは6位の誘導体をアクセプターとすることが判明した。そこで本研究では、これらの化合物の中から比較的安価に入手可能なキシロースをアクセプターとしたヘテロ二糖，グルコシルキシロース，の合成研究を行った。反応式は次の通りである。

G-1-P + xylose ⇌ glucosyl-xylose + Pi (3-3)

セロビオースホスホリラーゼは菌体より抽出精製して用いることも可能であるが、精製酵素の不安定性あるいは精製の手間などの問題が生じる。そこで今回の研究では酵素含有菌体を一種の固定化酵素として用いる方法を試みた。

Ⅲ-1-2.方法

セロビオースホスホリラーゼの酵素源として*C. gilvus* (ATCC 13127)を用いた。同菌を5 g/l Bactotryptone, 5 g/l 酵母エキス, 5 g/l NaCl, 2 g/l K_2HPO_4, 5 g/l カルボキシメチルセルロース（置換度0.51）の組成よりなる培地中、48 hr, 30℃にて回転振盪培養を行った。遠心分離により集菌後、菌体を-10℃においてアセトン中に分散させて、-10℃, 1 hr撹拌を行った。菌体をガラスフィルター濾過により集めて、さらに冷アセトンにより二回洗浄を行いさらに冷エーテルで洗浄後室温で風乾することによりアセトン処理菌体を得た。得られた処理菌体は秤量後4℃の50%エタノールに分散、30 min撹拌した後、蒸留水で2度洗浄した。このアセトン－エタノール処理菌体を固定化セロビオースホスホリラーゼとして用いた。

グルコシル－キシロースの合成は、アセトン処理菌体を秤量した後にエタノール処理を行い, 100 mM G-1-P, 100 mMキシロース, 5 mM $MgCl_2$を含んだ100 mM トリス－塩酸緩衝液(pH 7.0)（緩衝液E）に懸濁し、37℃において連続的に振盪することにより行った。

セロビオースホスホリラーゼの活性は、セロビオースの加リン酸分解反応におけるG-1-Pの増加を測定して調べた。測定は以下の組成の1 mlの反応液に50 mgの処理菌体を加え37℃, 5 minインキュベーションした後反応液を煮沸し酵素を失活させて、さらに遠心により菌体を除去した上清のG-1-P濃度を定量することにより測定した。反応液組成は、緩衝液A中10 mM, セロビオース, 5 mM $MgCl_2$である。セロビオースホスホリラーゼ1 Uは上記の条件において毎分1 μmolのG-1-Pを生じる酵素量として定義した。ホスホグルコムターゼ活性は、セロビオースホスホリラーゼ活性測定条件のセロビオースをG-1-Pに変えて、生成するグルコース－6－リン酸(G-6-P)濃度を定量することにより測定した。ホスホグルコムターゼ1 Uは上記の条件において毎分1 μmolのG-6-Pを生じる酵素量として定義した。G-1-Pは、ホスホグルコムターゼ－グルコース－6－リン酸デヒドロゲナーゼ法により[77]、G-6-Pはグルコース－6－リン酸デヒドロゲナーゼ法[100]により定量した。

全糖量は、フェノール－硫酸法[101]を用い等モルのグルコース, キシロース混合液を標準として測定した。還元糖量は、Somogyi[87]-Nelson[88]法を用いキシロ

ビオースを標準として測定した。ペーパークロマトグラフィーは、Toyo No.50濾紙上で溶媒系にn-ブタノール／ピリジン／水(6:4:4 by vol.)を用い上昇法により行った。濾紙上の還元糖の検出は硝酸銀－アルカリ法[102]により行った。

糖の高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による分析は、カラム，SCR101N（島津製作所，京都）；溶媒，水；カラム温度，60℃；流速，0.5 ml/minの条件で行った。検出には示差屈折率検出器を用いた。ガスクロマトグラフィー(GLC)はSE30カラム(3 m)（島津製作所）を用い、カラム温度160℃にて行った。FAB-MASS(Fast atom bombardment mass spectroscopy)は、JMS-HX110（日本電子）を用いグリセロールマトリックスにて測定した。^{13}C-NMRは、重水中でJNM-FX100（日本電子）にて内部標準にエタノールを用い25 MHzで測定した。^{1}H-NMRは重クロロホルム中JNM-GX400（日本電子）にて内部標準にテトラメチルシランを用い400 MHzで測定した。

糖のメチル化はHakomoriの方法[103]により行った。メタノリシスは完全メチル化糖を1Nメタノール－塩酸中、80℃，4 hr反応させることにより行った。部分メチル化糖はトリメチルクロロシラン－ヘキサメチルジシラザンを用いてトリメチルシリル誘導体に変換[104]してからGLCに供した。アセチル化は糖を無水酢酸／ピリジン(1:5 by vol.)中、60℃，2 hr反応させることにより行った。

Ⅲ-1-3.結果

セロビオースホスホリラーゼ含有菌体の調製

処理菌体の利用特性を調べるために、アセトン処理のみを行った菌体でセロビオースホスホリラーゼの逆反応を利用したセロビオースの合成実験を行った。1 mlの緩衝液E中に、100 mM G-1-P，100 mMグルコース，5 mM $MgCl_2$，50 mgアセトン処理菌体の組成からなる反応液を調製し、37℃において24 hr振盪して反応を行った。この反応液の2 μlをペーパークロマトグラフィーにより分析した。結果をFig. 3-1に示す。反応液からG-6-Pに相当する位置に強いスポットが検出されたが、セロビオースのスポットは弱かった（レーン3）。この結果はアセトン処理菌体がホスホグルコムターゼ活性を持っているために起こったものであると考えられ

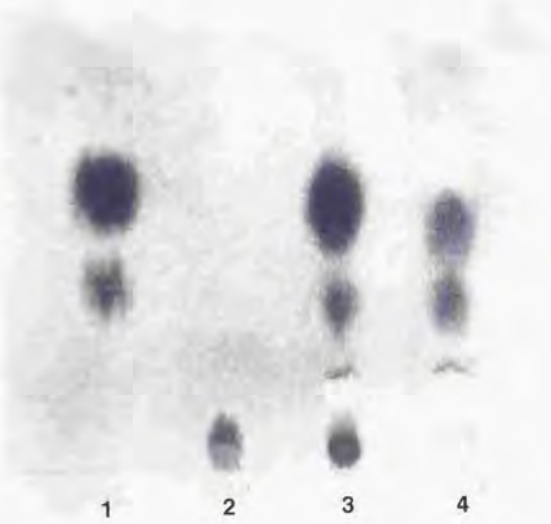


Fig. 3-1. Paper chromatogram of the products of the reaction.

Two microliter portions of reaction mixture were spotted on the paper. Lane 1, standard, glucose and cellobiose; Lane 2, standard, glucose-6-phosphate; Lane 3, reaction mixture of the acetone treated cells; Lane 4, reaction mixture of the acetone-ethanol treated cells.

る。すなわち(3-4)式に示したセロビオースホスホリラーゼによる反応の基質G-1-Pが(3-5)式のホスホグルコムターゼによる反応により消費されるため、結果的にセロビオースの生成量が少なくなるものと考えた。

$$\text{G-1-P} + \text{glucose} \rightleftharpoons \text{cellobiose} + \text{Pi} \qquad (3\text{-}4)$$

$$\text{G-1-P} \rightleftharpoons \text{G-6-P} \qquad (3\text{-}5)$$

そのため菌体の両酵素活性を調べた結果(Table 3-1)、この菌体は強いホスホグルコムターゼ活性を持つことが判明した。ホスホグルコムターゼは反応にグルコース－1，6－ビスリン酸(G-1,6-P)を必要とするが[105]、菌体を触媒とする場合はG-1,6-Pを特に加えなくても活性は発現した。

Table 3-1. Activity of cellobiose phosphorylase and phosphoglucomutase of the acetone-treated cells before and after the treatment with 50% ethanol

Treatment	Cellobiose phosphorylase (U/g cells)	Phosphoglucomutase (U/g cells)
before	2.1	6.1
after	1.3	< 0.1

ホスホグルコムターゼの菌体からの選択的除去方法を各種検討した結果、Ⅲ-1-2に記載したアセトン処理菌体を50%エタノールでさらに処理する方法により選択的除去が可能であることが判明した。Fig. 3-1示したように（レーン４）、アセトン－エタノール処理を行った菌体を用いて反応を行えばG-6-Pに相当するスポットは消失しセロビオースに相当するスポットが大きくなった。また酵素活性を測定した結果、セロビオースホスホリラーゼ活性は60%残存しているが、ホスホグルコムターゼ活性は検出されなくなった(Table 3-1)。以後の実験にはアセトン処理菌体を秤量後にこのエタノール処理を行った。

グルコシル－キシロース（ＧＸ）生成の経時変化

以後の実験は、グルコースとキシロースよりなるヘテロ二糖（ＧＸ）の合成に関して行った。ＧＸ生成の経時変化の観測はⅢ-1-2に記載した方法に従い、20

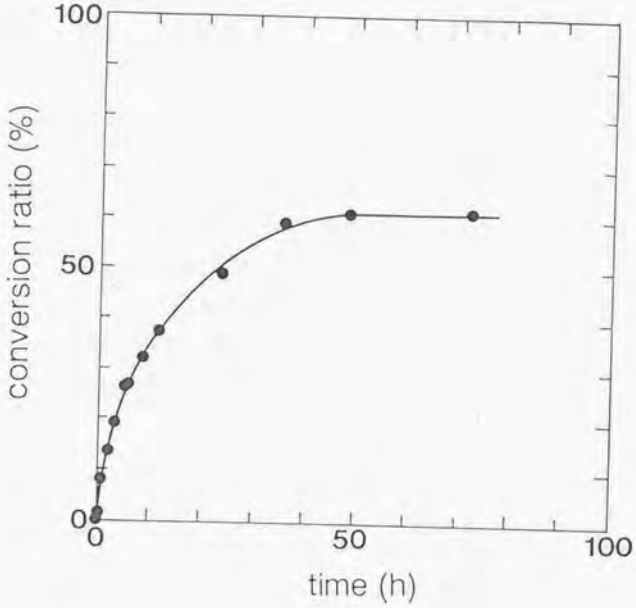


Fig. 3-2. Time course of GX formation.

mlの反応液中1 gの処理菌体を用いて行った。Fig. 3-2に示すように、キシロースおよびG-1-Pの60%が反応50 hr後にＧＸに変換され、その後はＧＸの生成量に変化は見られなかった。

ＧＸのグラムスケール調製

数グラムのＧＸの調製を目的として、Ⅲ-1-2に記載した方法に従い400 mlの反応液中5 gの処理菌体を用い72 hr反応を行った。反応液を遠心分離することにより菌体を除去し、得られた上清をイオン交換樹脂Amberlite MB3（オルガノ，東京）を用いて脱塩した。得られた溶液を活性炭カラム(2.6 cm径×90 cm)に通液し、糖を吸着させた。カラムを4 lの蒸留水で洗浄後、4 lの2%エタノール水溶液を通液して単糖画分を溶離させた。その後4 lの10%エタノール水溶液でＧＸを溶離させ、得られた溶離液をロータリーエバポレーターで蒸発乾固させることにより4.4 gのＧＸ・２水物を得た。原料からの収率は32%であった。

ＧＸの構造決定

ＧＸの全糖と還元力のモル比は２と決定されＧＸは還元性の二糖であることが示された。またＧＸは1N塩酸中100℃,2 hrの処理により等モルのグルコースとキシロースに完全に加水分解された。またＧＸはα－グルコシダーゼ（パン酵母由来，Sigma）では分解されず、β－グルコシダーゼ（アーモンド由来，Sigma）により等モルのグルコースとキシロースに分解された(Fig. 3-3)。FAB-MASSスペクトルはＧＸの分子量が312であることを示した(Fig. 3-4)。これらの結果はＧＸの構造がβ-D-glucosyl-D-xyloseであることを示している。FAB-MASSスペクトルの主要ピークはFig. 3-4中に示したように、この構造からのフラグメントとして帰属可能であった。

ＧＸの結合位置を決定するために、メチル化分析を行った。その結果、完全メチル化されたグルコースと1,2,3位がメチル化されたキシロースが検出されたため、キシロースの４位が結合に関与していることが判明した。

構造決定を確実にするために、ＧＸ完全アセチル化物の^{1}H-NMRを測定した。プロトンシグナルの同定は二次元COSY(^{1}H-^{1}H corelated spectroscopy)を用いて行った。COSYスペクトルをFig. 3-5に、またCOSYにより帰属決定された各プロトン

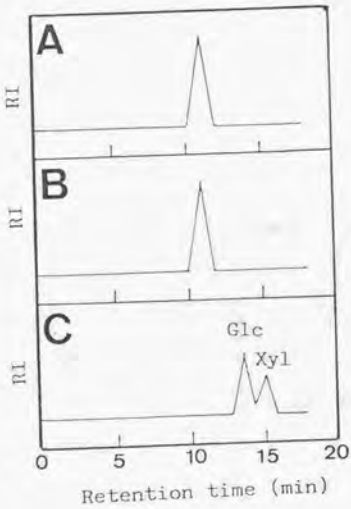


Fig. 3-3. Hydrolysis of GX.

Products formed by hydrolyses were analyzed by HPLC. A, Standard GX; B, hydrolyzed by α-glucosidas; C, hydrolyzed by β-glucosidase.

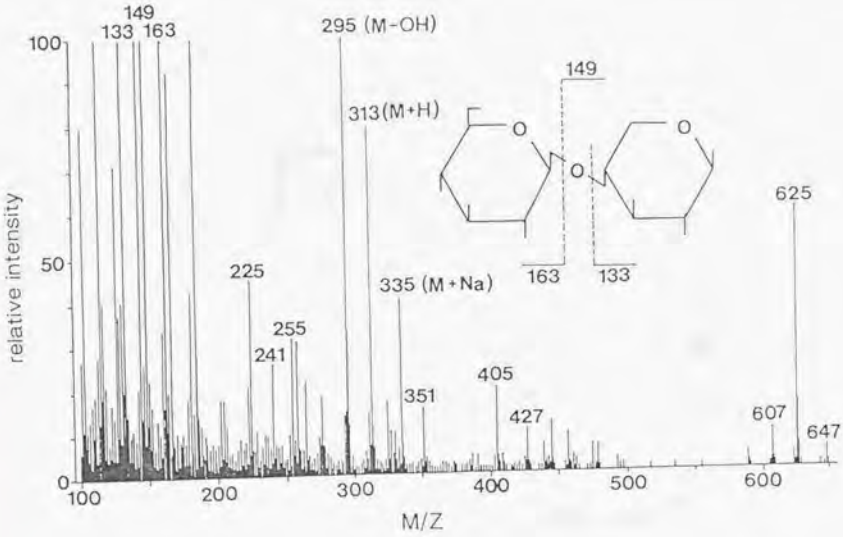


Fig. 3-4. FAB-MASS spectrum of GX.

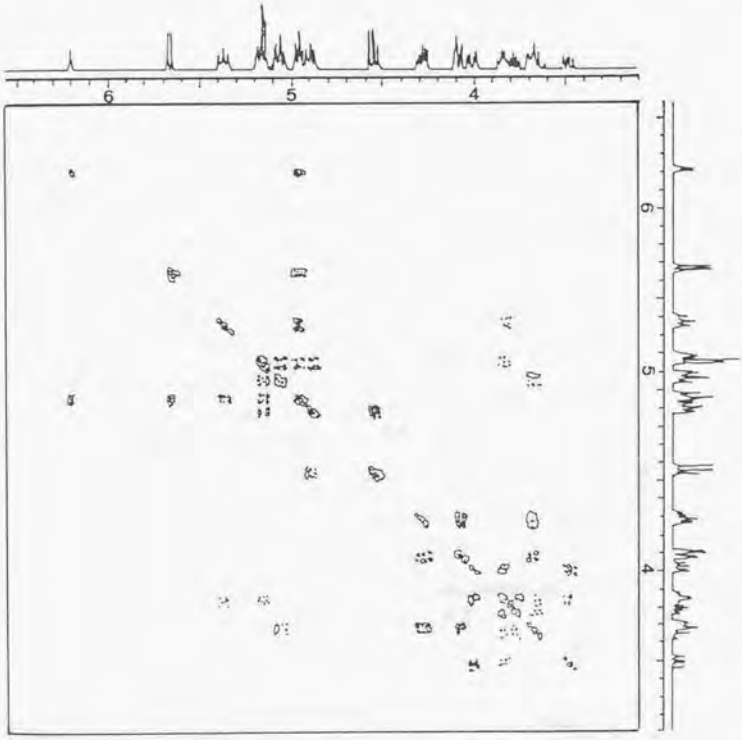


Fig. 3-5. ^{1}H-^{1}H COSY spectrum of acatylated GX.

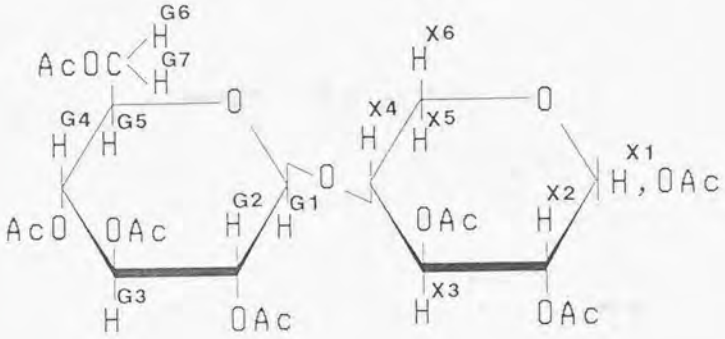


Fig. 3-6. Designation of protons of acetylated GX.

Table 3-2. Chemical shifts and coupling constants in the ^{1}H-NMR spectrum of peracetylated GX

	Chemical shift (δ ppm)			Coupling constant (Hz)	
	α-anomer	β-anomer		α-anomer	β-anomer
X1	6.22	5.67	$J_{X1,2}$	3.8	6.8
X2	4.97	4.94	$J_{X2,3}$	10.1	8.1
X3	5.38	5.17	$J_{X3,4}$	9.1	7.8
X4	3.86	3.86	$J_{X4,5}$	10.8	8.6
X5	3.66	3.50	$J_{X4,6}$	5.5	4.9
X6	3.79	4.02	$J_{X5,6}$	11.1	12.0
G1	4.55	4.57	$J_{G1,2}$	7.9	7.9
G2	4.90	4.91	$J_{G2,3}$	9.3	9.5
G3	5.17	5.17	$J_{G3,4}$	9.6	9.5
G4	5.08	5.07	$J_{G4,5}$	9.6	9.8
G5	3.70	3.70	$J_{G5,6}$	2.1	2.1
G6	4.10	4.10	$J_{G5,7}$	5.0	4.9
G7	4.31	4.29	$J_{G6,7}$	12.4	12.4

The α and β anomers indicate the anomeric forms of the xylopyranosyl residue.

Table 3-3. Assignments of chemical shifts on a ^{13}C-NMR spectrum of GX

	α-anomer	β-anomer		α-anomer	β-anomer
G1	101.3	101.3	X1	92.2	96.6
G2	73.0	73.0	X2	71.2	74.2
G3	76.1	76.1	X3	71.5	74.2
G4	69.7	69.7	X4	76.8	76.6
G5	75.7	75.7	X5	59.0	63.2
G6	60.9	60.9			

Values are given in δ ppm. The α and β anomers indicate the anomeric forms of the xylopyranose residue.

のケミカルシフトをTable 3-2に示した。なお各プロトンはFig. 3-6のように番号をつけた。G1がX1に比べて高磁場側にシフトしていること及びX4がX2，X3に比べて高磁場側にシフトしていることから結合位置はグルコースの1位とキシロースの4位であることが示される。また結合定数$J_{G1,G2}$が7.9 Hzであることは、G1，G2が両方ともアキシャルであることを示すためグルコースのアノマー型はβ型であることがわかる。これらの結果を総合してGXの構造は、4-*O*-β-D-glucopyranosyl-D-xyloseと決定された。GXの^{13}C-NMRを重水中で測定した結果をTable 3-3に示す。^{13}C-NMRの結果もこの構造を支持するものであった。

Ⅲ-1-4.考察

セロビオースホスホリラーゼを利用した、従来あまり知られていなかったヘテロオリゴ糖であるGXの簡易な合成法を確立した。*C. gilvus*アセトン処理菌体をそのまま酵素源として用いた場合には混在するホスホグルコムターゼ活性によりG-1-PがG-6-Pに変換されるためGX合成の収率低下を引き起こすことが予想された。実際にこの条件で二糖合成を行うと、ヘテロ二糖の生成はペーパークロマトグラム上でほとんど観測できなかった。しかしながらこの菌体にさらにエタノール処理を行うことにより簡便にホスホグルコムターゼ活性を除去できることを明らかにした。この発見によりセロビオースホスホリラーゼを菌体から抽出すること無しに菌体を固定化酵素として使うことが可能になった。培養菌体の直接のエタノール乾燥処理も試みたがこの処理ではホスホグルコムターゼ活性を除けなかった。この結果は、活性の選択除去が酵素失活に起因するものではなく、アセトン処理菌体からの50%エタノールによる酵素の溶出の可能性を示唆している。

GX生成の経時変化の実験において、反応50 hr後に約60%の変換率に達し以後にGX濃度に変化が観測されなくなった。この変換率はⅡ－1に記載した精製セロビオースホスホリラーゼを用いたグルコースとG-1-Pからのセロビオースへの平衡時の変換率(64%)とほぼ一致している。このためGX生成反応は平衡に達しているものと考えられる。

GXの無水物は本研究では得られなかった。二水物の融点範囲は90.5-92℃であ

り、二水物を真空中90℃で乾燥して得られる一水物の融点範囲は108.5-110℃であった。ＧＸは本研究においては結晶化できなかった。なお、Alexanderは*C. thermocellum*の部分精製セロビオースホスホリラーゼを用いたＧＸの合成を報告しているが[51]、この報告においてもＧＸの結晶化には成功していない。

ＧＸは構造決定の結果、セロビオースとキシロビオースの中間的な構造を持つことが示された。ＧＸ，セロビオース，キシロビオースの性質をTable 3-4にまとめた。ＧＸの平衡化後の旋光度は-8°であり、セロビオースとキシロビオースとの中間の値を示した。溶解度は25℃において21%(w/w)であり、やはりセロビオース(11%)とキシロビオース(48%)との中間値を示した。そのほかの性質もこれらの中間的な値を示すことが期待される。

Table 3-4. Properties of GX compared with cellobiose and xylobiose

	$[\alpha]_D^{25}$	Solubility
GX	-8°	21%(w/w)
Cellobiose	+34°	11%(w/w)
Xylobiose	-25°	48%(w/w)

Specific optical rotation was measured in water.
Solubility to water was determined at 25°C.

セロビオースとキシロビオースは近年新しい食品素材として注目されつつある。セロビオースを含むセロオリゴ糖の水分活性あるいは可溶性食物繊維としての利用[106,107]、キシロビオースのビフィズス菌増殖因子としての作用[108]などが報告されている。このような目的においてセロビオースやキシロビオースはそれぞれセルロースおよびキシランの酵素による限定加水分解による製造法が検討されている。本研究においてＧＸはG-1-Pとキシロースから簡便に合成できることが示された。現在G-1-Pは試薬レベルとしてのみ市販されている。G-1-Pは、ホスホリラーゼを用いて澱粉から[109]あるいはスクロースホスホリラーゼを用いてスクロースから[29]容易に調製することが可能である。これらの方法によりG-1-Pの安価な供給が可能になれば、ＧＸの食品用途への利用も可能になると考えられる。ま

たＧＸのセロビオースとキシロビオースの中間的な構造を利用した*C. gilvus*のキシラナーゼの反応解析についてはⅢ－５で述べる。

Ⅲ－2．スクロースのみを原料としたセロビオースの合成

Ⅲ-2-1.序

近年各種のオリゴ糖が機能性食品素材として注目されている[3]。グルコース2分子がβ-1,4結合している二糖類であるセロビオースもビフィズス増殖因子や難消化性オリゴ糖として注目されている物質の一つである[106]。セロビオースの構造はセルロースの最低構造単位として知られる。

セロビオースの調製は、通常セルロースの化学的あるいは酵素的分解により行われる。セロビオースを通常収率よく得る方法としては、セルロースの加酢酸分解による方法が古くから知られている[110]。すなわちセルロースを濃硫酸－無水酢酸でアセトリシスすることにより、セロビオースオクタアセテートを選択的かつ高収率で得ることができる。これを脱アセチルすることによりセロビオースを調製する。またセルロースの酸による限定加水分解により直接セロビオースを調製する方法も報告されている[111-114]。しかしながらこの方法ではセロビオースの収率は低く、また単糖や重合度3以上のオリゴ糖の副生成も避けられない。そのためこの方法は、セロビオースよりはむしろ重合度3以上のセロオリゴ糖の調製に用いられる。セルロースのセルラーゼによる加水分解によりセロビオースを得る方法も数多く報告されている。セロビオヒドロラーゼ[EC 3.2.1.91]と呼ばれる一種のセルラーゼを用いてセルロースを分解すると、高収率でセロビオースが得られることが知られている[115-118]。また、*C. gilvus*[119,120]などある種の微生物のセルラーゼ系をそのまま用いれば、高収率でセロビオースが得られると報告されている。

しかしながら、アセトリシスの方法は生成物を脱アセチルする必要がありプロセスがやや煩雑になる。また、この方法は強酸を用いるので食品素材として用いるには安全性の問題を考慮する必要が生じる。酸加水分解の方法はセロビオースを収率よく得ることが難しく、多くの部分がグルコースまで分解されてしまう。またアセトリシスと同様の安全性の問題も生じる。酵素法においては、セルロースを十分な強度で分解するセルラーゼを十分安価に得ることが未だできていない

問題がある。また収率もアセトリシスに比べて高くない。セルロースは農産廃棄物の大きな部分を占めるが、この場合、ヘミセルロース，リグニンなどとの混合物として存在している。そのため、農産廃棄物などのバイオマスからセルロースを得る場合には夾雑物からの単離が必要でありコストがかかることになる。

そのほかにセロビオースを調製する方法として、(3-6)式のセロビオースホスホリラーゼの逆反応を利用してG-1-Pとグルコースからセロビオースを合成する方法が考えられる。

$$\text{G-1-P} + \text{glucose} \rightleftharpoons \text{cellobiose} + \text{Pi} \qquad (3\text{-}6)$$

しかしながらこの方法は、G-1-Pが安価でないためセロビオースを安価に生産することができない。また、反応副生成物としてリン酸が生じる。その他セロビオースホスホリラーゼは、Ⅱ－1に示したように基質グルコースにより阻害がかかるので反応系の基質濃度を高く設定することが難しいという問題点が残る。

そこで、本研究においては新たなセロビオースの生産法を考案した。すなわち3つの酵素の反応を同時に行うことにより、スクロースを原料としてセロビオースを生産する方法である。反応系は以下の通りである。

sucrose + Pi	⇌G-1-P + fructose	(sucrose phosphorylase)	(3-7)
fructose	⇌glucose	(xylose isomerase)	(3-8)
G-1-P + glucose	⇌cellobiose + Pi	(cellobiose phosphorylase)	(3-9)
sucrose	⇌cellobiose	(catalytic amount of Pi)	(3-10)

まず(3-7)式の反応により、スクロースをスクロースホスホリラーゼで加リン酸分解して、G-1-Pとフラクトースを得る。得られたフラクトースに(3-8)式のようにキシロースイソメラーゼを作用させることによりグルコースに異性化する。さらに(3-9)式のようにG-1-Pとグルコースをセロビオースホスホリラーゼと反応させることにより、セロビオースとリン酸を得る。この三つの反応を合計すると、両辺からリン酸，フラクトース，G-1-P，グルコースの項を消去することができ、(3-10)式が得られる。この結果は、スクロースを触媒量のリン酸の存在化に上記三酵素を同時に作用させれば、セロビオースを生じることを示している。また、

(3-7)式に示したスクロースホスホリラーゼの反応の平衡は右寄り[121]、(3-8)式に示したキシロースイソメラーゼの反応は中立[122]、(3-9)式に示したセロビオースホスホリラーゼの反応はⅡ－1に示したように右寄りであることが知られている。そのため(3-10)式の反応系の平衡はセロビオースに寄っていることが予想される。さらに、この反応系では原料はスクロースと触媒量のリン酸のみであるため、安価な原料によるセロビオース生産の可能性が示されたことになる。そこでこの反応系を実証し、セロビオースの安価な製造法を確立することを目的として本研究を行った。

Ⅲ-2-2.方法

スクロースホスホリラーゼは、Sigmaにより市販されている*Leuconostoc mesenteroides*由来の部分精製品を用いた。キシロースイソメラーゼは、グルコースイソメラーゼの名称で関東化学（東京）により市販されている*Streptomyces*の乾燥菌体から以下の方法で抽出して用いた。1 gの菌体を10 mlの50 mMイミダゾール－塩酸緩衝液（pH 7.0，緩衝液F）中に分散し超音波破砕処理を行った。破砕処理液を遠心分離して菌体を除去した。上清に80%飽和濃度になるまで硫酸アンモニウムを加え、生じた沈澱を遠心分離により集めたものをキシロースイソメラーゼとして用いた。セロビオースホスホリラーゼは、Ⅱ－1に記載した方法で調製した*C. gilvus*の菌体抽出液に対して、Ⅱ－1に記載した酵素精製法の内DEAE-Toyopearl 650Sによる陰イオン交換クロマトグラフィーのみ行ったものを用いた。

スクロースホスホリラーゼ1 Uは、緩衝液F中37℃において10 mMスクロース，10 mM Piから1 μmol/minの速度でG-1-Pを生成する酵素量として定義した。キシロースイソメラーゼ1 Uは、緩衝液F中37℃において10 mMフルクトースから1 μmol/minの速度でグルコースを生成する酵素量として定義した。セロビオースホスホリラーゼ1 Uは、緩衝液F中37℃において10 mMセロビオース，10 mM Piから1 μmol/minの速度でG-1 Pを生成する酵素量として定義した。G-1-Pはホスホグルコムターゼ－グルコース－6－リン酸デヒドロゲナーゼ法により[77]、グルコースは、グルコースCテストワコーを用いて定量した。反応液中のセロビオースとス

クロースは、示差屈折率計を備えたHPLCで、カラムにLiChrosorb NH2 (Cica-Merck, 東京) を用い、溶媒, アセトニトリル／水 65:35 (by vol.)；流速, 1 ml/min；カラム温度, 室温の条件で定量した。

Ⅲ-2-3.結果

2 mlの緩衝液F中に、100 mM スクロース, 10 mM Pi, 0.26 U/mlスクロースホスホリラーゼ, 0.034 U/mlキシロースイソメラーゼ, 0.21 U/mlセロビオースホスホリラーゼからなる反応液を調製し、37℃において反応を行った。結果をFig. 3-7に示す。スクロース濃度は反応初期から減少し、反応100 hrにおいて17 mMになった。それにともないセロビオース濃度は増加し、反応時間100 hrに76 mMに達した。この結果は、76%の高反応収率でセロビオースがスクロースから1ステップで合成できたことを示している。

次の実験においてセロビオースの単離を試みた。10 mlの緩衝液F中に200 mMスクロース, 20 mM Pi, 0.26 U/mlスクロースホスホリラーゼ, 0.034 U/mlキシロースイソメラーゼ, 0.21 U/mlセロビオースホスホリラーゼからなる反応液を調製し、37℃において100 hr反応を行った。反応終了時のセロビオース濃度は、147 mM (収率73%) であった。反応液を煮沸して酵素を失活させてから、インベルターゼ (from bakers yeast, grade V, Sigma)処理をして残存するスクロースを分解した。この溶液を活性炭カラム(1.5 cm径×30 cm)に通液し糖をカラムに吸着させた。カラムを水洗後2%エタノールで洗浄することにより単糖を溶出させてから、セロビオースを25%エタノールを用いて溶出させた。セロビオース含有画分を凍結乾燥することにより360 mgのセロビオースを得た。さらに水－エタノールによる結晶化を行い286 mgの結晶β-セロビオピラノースを得た。最終的な収率は42%であった。

Ⅲ-2-4.考察

ここで得られた結果は、セロビオースは75%以上の収率でスクロースのみを原料として合成することができることを示している。すなわち、三酵素の組み合わせ

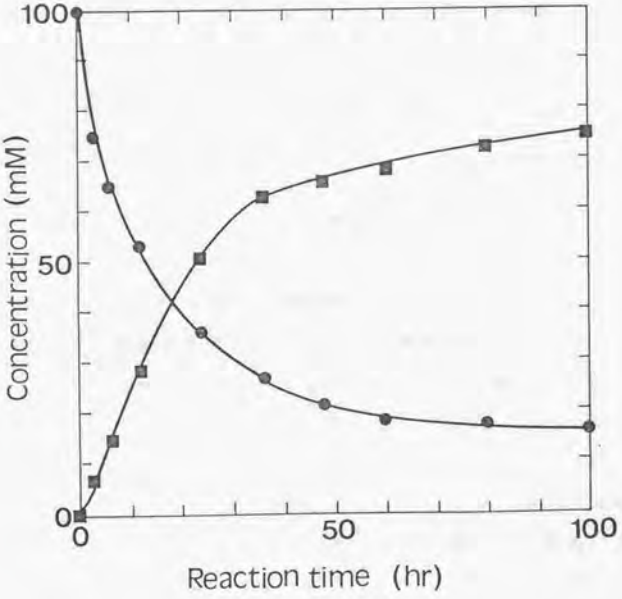


Fig. 3-7. Time course of the enzymatic synthesis of cellobiose.

●, sucrose; ■, cellobiose.

反応によるセロビオース生産の可能性が実証されたことになる。スクロースは安価でかつ入手の容易な原料であるため、この反応系は実用性の高い方法であると考えられる。

反応系に用いた酵素のうちキシロースイソメラーゼは、工業的にはグルコースイソメラーゼの呼称でグルコースの異性化反応に用いられており、比較的安価に入手できる。スクロースホスホリラーゼはリン酸の定量を目的に臨床検査試薬として用いられている酵素である[23]。現状では工業的に利用されていないが、最近酵素のクローニングと大腸菌を用いた大量発現が報告されており[24]将来安価に入手できることが期待される。セロビオースホスホリラーゼは、現在まで安価にかつ大量に入手する方法は報告されていない。しかしながら遺伝子操作法などによりセロビオースホスホリラーゼの大量調製が可能になれば、この三つの酵素の組み合わせによるセロビオースの生産法は、実現性の高い方法になる。

今回の実験ではセロビオースの単離収率は42%であった。これはスケールアップ、あるいは単離の最適条件を検討することによりさらに向上することが可能であろう。またスクロースからの収率は約75%であったが、固定化酵素を用いて反応を連続化させること，触媒として用いるリン酸濃度の最適化，未反応スクロースの再利用などを考えることにより、反応収率をさらに上昇させることも可能であると考えられる。

セロビオースをセルロースから調製する方法においては、ヘミセルロース，リグニンとの分離の問題から原料のセルロースを安価に得ることは難しいと思われる。生産法の問題点が原料にあった場合には、これを解決するための一般的な方法は知られていない。そのため将来においてもセルロースの安価な供給は困難を伴うことが予想される。今回開発したスクロースからのセロビオース合成法においては、酵素を得る方法にまだ問題点が多いが、原料は通常の砂糖あるいは糖蜜などを用いればよいので安価に入手できる。近年遺伝子操作法の発達により、酵素生産の問題の解決のためには組換微生物を用いる方法が一般的に用いられている。このため今回開発した方法は、セロビオースの安価な製造を考える場合現状では最も現実的な方法になると考えられる。

Ⅲ－3．スクロースのみを原料としたラミナリビオースの合成

Ⅲ-3-1.序

近年各種オリゴ糖の機能性食品への利用が数多く報告されている[3]。これらのオリゴ糖の内、β-グルコシル結合を持つオリゴ糖は結合切断酵素が消化酵素に含まれていないため低カロリーかつビフィズス増殖因子となることが期待される。ラミナリビオースはグルコース２分子が、β-1,3結合した構造の還元性二糖類でありこれらの機能性が期待される化合物である。

ラミナリビオースの製造法としては、β-1,3-グルカンの酸あるいは酵素的限定分解による方法が報告されている。例えば、β-1,3-グルカンを無水酢酸－硫酸を用いてアセトリシスしてラミナリビオースオクタアセタテートを調製する方法が報告されている[123]。この方法は、セルロースのアセトリシスによるセロビオースオクタアセテートの調製[110]と比較すると二糖の収率が高くない。また、酸による限定加水分解による方法も知られているが[124]、この方法は二糖の収率が高くないためむしろ三糖以上のオリゴ糖調製に用いられる方法である。酵素による限定加水分解によるラミナリビオースの調製法もいくつか報告されている。Kusamaらは放線菌由来のβ-1,3-グルカナーゼを用いカードランをグルコースとラミナリビオースに分解しグルコースを酵母に資化させて除くことにより30%の収率で結晶ラミナリビオースを得た[125]。Villaらは酵母*Kluyveromyces phaseolosporus*由来の酵素によりラミナリンから46%の収率でラミナリビオースが得られることを報告した[126]。またKuzuharaらは細胞壁溶解酵素として市販されているキタラーゼを用いて高収率でラミナリビオースを調製した[127]。

β-1,3-グルカンはその起源により、ラミナリン，パキマン，パラミロン，カードランなど各種のものが知られている。これらのうち、微生物による発酵生産により生産されるカードランが最も安価であると考えられる[128]。しかしながら、カードランの価格は¥4000/kg程度と高価である。そのためこれらの方法で安価にラミナリビオースを製造するためには、反応収率を高めかつ反応にかかる費用を低減するとともに、β-1,3-グルカンの安価な製造法を開発する必要がある。従っ

てこれらの方法を実用化することは難しいと言わざるを得ない。

原料の問題点を解決するために、β-1,3-グルカン以外の原料からラミナリビオースを製造することを考えた。二糖類加リン酸分解酵素の利用研究の一環として、本研究においてⅢ－２に記載したように、スクロースのみを原料としたセロビオースを合成を実証した。この方法では、スクロースにリン酸の存在下スクロースホスホリラーゼ，キシロースイソメラーゼ，セロビオースホスホリラーゼを作用させてセロビオースを合成する。ここで３つの酵素の内セロビオースホスホリラーゼをラミナリビオースホスホリラーゼに変えれば、同じ方法を用いてラミナリビオースが合成できることが予想される。すなわち以下の反応式によるラミナリビオースの合成である。

sucrose + Pi ⇌ G-1-P + fructose (sucrose phosphorylase) (3-11)

fructose ⇌ glucose (xylose isomerase) (3-12)

G-1-P + glucose ⇌ laminaribiose + Pi (laminaribiose phosphorylase) (3-13)

---

sucrose ⇌ laminaribiose (catalytic amount of Pi) (3-14)

(3-11)～(3-13)より得られた(3-14)式からは、スクロースを原料として触媒量のリン酸の存在下にスクロースホスホリラーゼ，キシロースイソメラーゼ，ラミナリビオースホスホリラーゼを作用させることによりラミナリビオースを合成できることを示している。しかしながらⅡ－２で示した通り、セロビオースホスホリラーゼは三糖を合成する活性がないがラミナリビオースホスホリラーゼは三糖以上のオリゴ糖を合成する活性を持つ。このため、式(3-14)によるラミナリビオースの合成では、Ⅲ－２のセロビオース合成の場合と異なり三糖以上の反応副生成物を生じることが予想される。そこでこの方法によるラミナリビオース合成の可能性を探るために以下の研究を行った。

Ⅲ-3-2.方法

スクロースホスホリラーゼは、Sigmaにより市販されている*Leuconostoc mesenteroides*由来の部分精製品を用いた。キシロースイソメラーゼは、グルコースイソメラーゼの名称で関東化学（東京）により市販されている*Streptomyces*の乾燥菌体からⅢ-2-2に記載した方法で抽出して用いた。ラミナリビオースホスホリラーゼは、Ⅱ-2-2に記載した方法のうち一回目の疎水性クロマトグラフィーまで行ったラミナリビオースホスホリラーゼ画分を用いた。

スクロースホスホリラーゼ、キシロースイソメラーゼの活性の定義および測定はⅢ-2-2に記載した方法で行った。ラミナリビオースホスホリラーゼ1 Uは緩衝液F中37℃において10 mM G-1-P, 10 mMグルコースから1 μmol/minの速度でPiを遊離する酵素量として定義した。PiはLowry-Lopetzの方法[79]により定量した。

反応液中のラミナリビオース，スクロース，重合度3以上のオリゴ糖および単糖は、示差屈折率計を備えた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で、カラム，LiChrosorb NH2；溶媒，アセトニトリル／水　80:20 (by vol.)；流速 1 ml/min，カラム温度，室温の条件で定量した。生成した糖の同定は、ラミナリオリゴ糖標品（焼津水産化学）を標準として、HPLCを用いて上記条件およびカラム，LiChrosorb RP18 (Cica Merck)；溶媒，水；流速，1 ml/min；カラム温度，室温の条件にて行った。

Ⅲ-3-3.結果

2 mlの緩衝液F中に200 mMスクロース，20 mM Pi，0.47 U/mlスクロースホスホリラーゼ，0.072 U/mlキシロースイソメラーゼ，0.37 U/mlラミナリビオースホスホリラーゼ，5 mM $MgCl_2$を含んだ反応液を調製し、37℃にて反応を行った。反応の経時変化をFig. 3-8に示す。スクロースは反応経過につれて減少し、48 hr後には検出されなくなった。ラミナリビオースはスクロースの減少にともない増加した。濃度は48 hr後に110 mMに達した。ラミナリトリオースは反応18 hrから観測され、最終的に22 mMになった。フルクトースとグルコースは反応経過にともない

増加し、それぞれ46 mMと31 mMになった。また48 hrの時点で痕跡量のラミナリテトラオースも観測された。

本実験で得られたラミナリビオース，ラミナリトリオースの２つのHPLCカラムにおける保持時間はそれぞれの標準品のものと一致した。さらに生成ラミナリビオースの構造を確定させるために^{13}C-NMRの測定を行った。1 mlの反応終了液にインベルターゼ処理を行い残存するスクロースを完全に分解した後、Toyopearl HW 40Sカラム(2.5 cm径×40 cm)によるゲル濾過（溶媒：水）にかけることにより二糖画分を分離し、凍結乾燥を行って25 mgの白色粉末を得た。JNM-GX400を用い重水中でジオキサン(67.4 ppm)を標準として^{13}C-NMRスペクトルを測定した。結果はFig. 3-9に示した通りβ-1,3結合したグルコースの二糖であることを示すものであった。また標準ラミナリビオースのスペクトルと完全に一致したことから、得られた二糖がラミナリビオースであることが確認された。

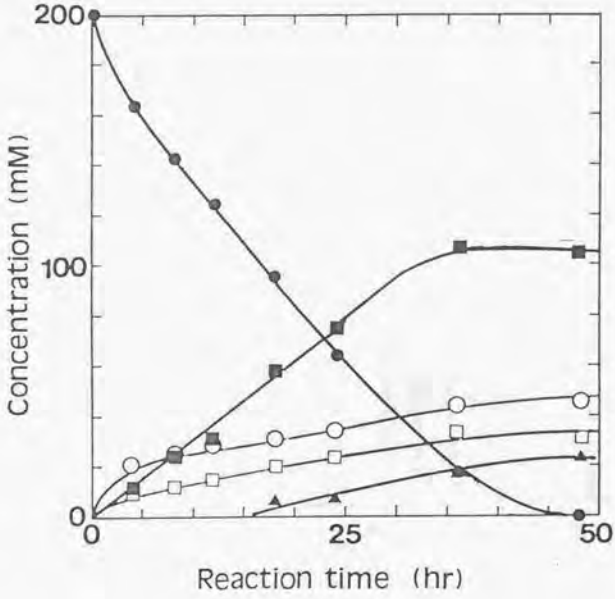


Fig. 3-8. Time course of the enzymatic synthesis of laminaribiose.

●, sucrose; ■, laminaribiose; ▲, laminaritriose; ○, fructose; □, glucose.

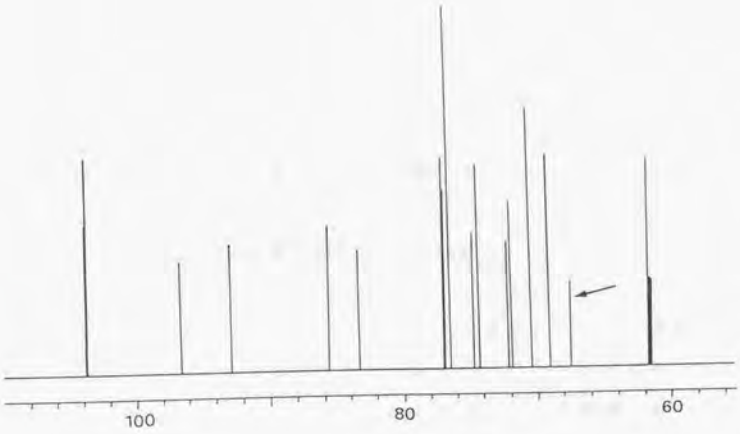


Fig. 3-9. A ^{13}C-NMR spectrum on the laminaribiose synthesized in the reaction.

Values are indicated in δ ppm. Dioxane was used as an internal standard (67.4 ppm, indicated by an arrow).

Ⅲ-3-4. 考察

Ⅲ－2のセロビオース合成の場合は、セロビオースはスクロースの減少に対しほぼ定量的に増加するが、ラミナリビオース合成の場合は必ずしも定量的には増加しなかった。またラミナリビオース合成の場合重合度3以上のオリゴ糖の生成を伴った。この原因は、Ⅱ－2に記載した通りセロビオースホスホリラーゼはセロビオースを全くアクセプターとしないことに対してラミナリビオースホスホリラーゼはラミナリビオースをもアクセプターとするためであると考えられる。よって、ラミナリトリオース及びラミナリテトラオースの生成は以下の反応式による副反応が原因であると推定される。

laminaribiose + G-1-P ⇌ laminaritriose + Pi (3-15)

(laminaritriose + G-1-P ⇌ laminaritetraose + Pi) (3-16)

ラミナリビオースのスクロースからの合成収率は55%であった。この結果は、ラミナリビオースが安価な原料であるスクロースから効率よく生産できることを示している。Ⅲ－2にも記載した通り、キシロースイソメラーゼは工業的に市販されている酵素であり、スクロースホスホリラーゼの組換酵素の工業的生産[24]も報告されている。ラミナリビオースホスホリラーゼの量産法は確立されていないが、この点が解決されればラミナリビオースの工業的量産法が確立されることになろう。

さらにラミナリトリオースの副生成について考察する。反応式(3-15)を考慮すると1 molのラミナリトリオースは2 molのスクロースから生成する。ラミナリトリオースのモル収量22 mMは、44 mMのスクロースを消費したことを意味している。そのため、ラミナリビオースをアクセプターとしないラミナリビオースホスホリラーゼを発見できれば、ラミナリビオースの収率は大きく改善できることが予想される。

Ⅲ－4.ラミナリオリゴ糖の合成

Ⅲ-4-1.序

ラミナリオリゴ糖は、グルコースが数個β-1,3結合した構造のオリゴ糖であり、β-グルカン分解酵素特にβ-1,3-グルカナーゼの研究に有用な物質である。近年各種オリゴ糖を食品として利用した時の機能性が報告されており[3]、ラミナリオリゴ糖も新たな食品素材として期待されるオリゴ糖の一つである。レンチナン、シゾフィランなどのある種のβ-1,3-グルカンには免疫賦活活性が報告されており[129]、その基本骨格であるラミナリオリゴ糖もこのような活性を持つ可能性が期待される。また硫酸化カードラン（β-1,3-グルカン）の、AIDS (aquired immuno deficiency syndrome)の原因ウイルスであるHIV (human immuno-deficiency virus)の感染防御機能が報告されており[130]、ラミナリオリゴ糖の誘導体もその活性が期待される。最近Uryuらは、ラミナリオリゴ糖の硫酸化アルキル誘導体がHIV感染防御能を持つことを発見した[131]。

ラミナリオリゴ糖の製造法としては、パキマンなどのβ-1,3-グルカンの酸による限定加水分解による方法が知られている[132]。しかしながらこの方法は収率が低く、また得られるオリゴ糖の分子量制御が難しい欠点を持っている。この問題点を解決するために、原料にβ-1,3-グルカンを用いないラミナリオリゴ糖の合成法を検討した。

*Euglena gracilis*は菌体内に、ラミナリビオースホスホリラーゼ[EC 2.4.1.31][57]およびβ-1,3-オリゴグルカンホスホリラーゼ[EC 2.4.1.30][62]を持つことが知られている[61]。これらの酵素はラミナリオリゴ糖を加リン酸分解して重合度の一つ少ないラミナリオリゴ糖とG-1-Pを生じる可逆反応を触媒する酵素である。両者は、ラミナリビオースとラミナリトリオースを分解する活性の強弱により区別されている[60,61]。本研究では両酵素の逆反応を利用したラミナリオリゴ糖の合成についての検討を行った。すなわちグルコースとグルコース－1－リン酸を出発原料として酵素反応を行い、以下に示すように逐次重合度を増加させることにより一段階でラミナリオリゴ糖を合成する方法である。

$$Glc + G\text{-}1\text{-}P \rightleftharpoons LG_2 + Pi \quad (3\text{-}17)$$

$$LG_2 + G\text{-}1\text{-}P \rightleftharpoons LG_3 + Pi \quad (3\text{-}18)$$

$$\vdots$$

$$LG_n + G\text{-}1\text{-}P \rightleftharpoons LG_{(n+1)} + Pi \quad (3\text{-}19)$$

(LG_n:重合度nのラミナリオリゴ糖)

この方法を用いれば反応生成物としてラミナリオリゴ糖の混合物が得られると考えられる。ここで、原料のグルコースとグルコース－1－リン酸の比を変化させれば、得られるオリゴ糖の平均重合度が変化することが予想される。上記の方法を実証するとともに、ラミナリオリゴ糖の合成条件を決定するために以下の実験を行った。

Ⅲ-4-2.方法

E. gracilis Z (IAM E-6)の培養はⅡ－2に記載した方法で行った。遠心分離により集菌された菌体の内1 gを4 mlの緩衝液B中で超音波破砕処理を行い、さらに遠心分離をかけることにより、ラミナリビオースホスホリラーゼおよびβ-1,3-オリゴグルカンホスホリラーゼを含んだ菌体抽出液を得た。酵素活性の測定法は、Ⅱ-2-2に記載した方法で行った。上清は1.11 U/mlの活性Ⅰ（ラミナリビオース生成活性）と1.66 U/mlの活性Ⅱ（ラミナリトリオース生成活性）を持っていた。G-1-P加水分解活性及びホスホグルコムターゼ活性は検出されなかった。またグルコースの各種の二糖を加えてG-1-P（α－グルコース－1－リン酸）を生じる活性を調べたが、ラミナリビオース以外にG-1-Pを生じる二糖はなかった。*E. gracilis*はトレハロースホスホリラーゼを持つことが知られているが[63]、β－グルコース－1－リン酸を生じる酵素であるためG-1-Pは生じない。

ラミナリオリゴ糖の定量は示差屈折率検出器を備えたHPLCを用い、カラム，Hibercolumn LiChrosorb NH2；溶媒，アセトニトリル／水　65:35 (by vol.)；流速，2 ml/min；カラム温度，室温の条件で行った。ラミナリオリゴ糖の標準品は焼津水産化学工業製の標品(D.P. 2-7)を用いた。G-1-Pの定量はホスホグルコムターゼ－グルコース－6－リン酸デヒドロゲナーゼ法により行った[77]。PiはLowry-

Lopezの方法により定量した[78]。

Ⅲ-4-3.結果

ラミナリオリゴ糖の合成は緩衝液B中に酵素液400 μl, G-1-P 100 mM, $MgCl_2$ 5 mM, NaN_3 0.02%, グルコース 5～100 mMを含んだ5 mlの反応液を調製し、37℃にて48 hr反応させることにより行った。反応液は5種類用意し、それぞれグルコース濃度は100, 50, 25, 10, 5 mMに調製した。反応液のG-1-P濃度の経時変化をFig. 3-10に示した。全ての試料でG-1-Pの減少がみられた。グルコース初濃度が高い試料の方がG-1-Pの消費速度が速く、また反応48 hr後の最終的なG-1-P消費量が多かった。しかしながらこのG-1-P消費量は特にグルコース初濃度が低い反応液では平衡に達していないと考えられる。

反応48 hrの反応液はAmberlite IR-120BおよびAmberlite IRA93のカラムを通液することにより脱塩してHPLCによる分析に供した。結果をTable 3-5およびFig 3-11に示した。グルコースの初濃度を変えることにより1～9糖の混合物から2～14糖の混合物までが生成した。なお、生成したオリゴ糖のうち7糖までのHPLCでの保持時間は標準ラミナリオリゴ糖のものと完全に一致した。それ以上のオリゴ糖については標準サンプルがないためにHPLCによる構造確認はできなかったが、各オリゴ糖が対称的なピークをクロマトグラム上に示したこと及び酵素の性質から、得られるオリゴ糖はすべてβ-1,3-結合のみからなるラミナリオリゴ糖であると考えられる。Table 3-5およびFig. 3-11より明らかなように、得られるオリゴ糖の平均重合度はグルコース初濃度が小さいほど大きくなった。例えばグルコース初濃度がG-1-P初濃度と同じ100 mMである場合には平均重合度は 1.8であるが、5 mMである時には8.4であった。なお平均重合度は、残存するグルコースも考慮にいれて計算した。数平均分子量M_nと重量平均分子量M_wはそれぞれTable 3-5に示したように計算された。不均一度V (M_w/M_n)はすべての場合に1.1～1.4の範囲であった。

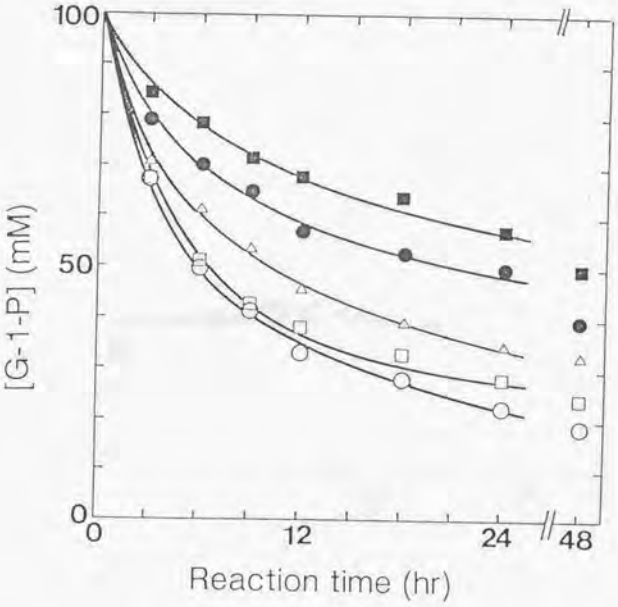


Fig. 3-10. Time course of the concentration of G-1-P.

Initial concentrations of glucose were: ○, 100 m$\underline{\underline{M}}$; □, 50 m$\underline{\underline{M}}$; △, 25 m$\underline{\underline{M}}$; ●, 10 m$\underline{\underline{M}}$; ■, 5 m$\underline{\underline{M}}$.

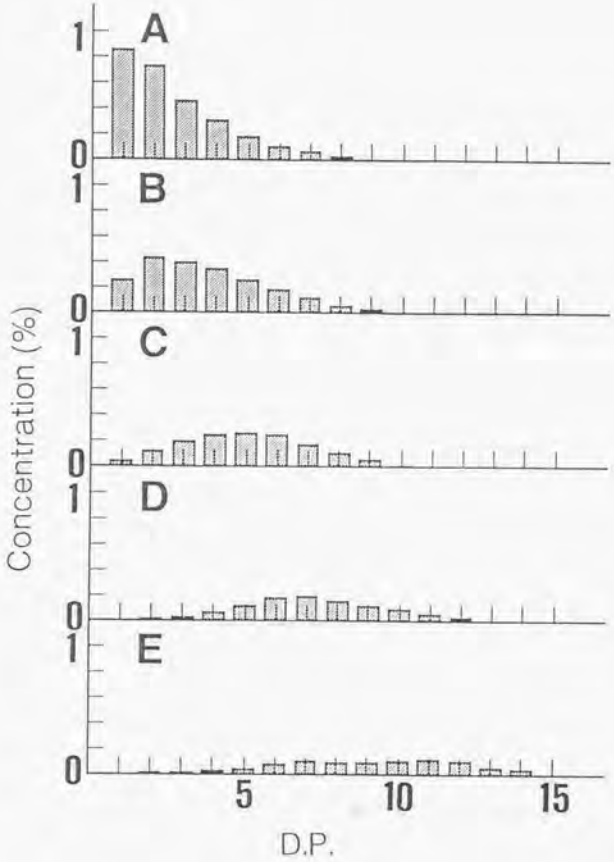


Fig. 3-11. Concentration of laminarioligosaccharides after 48 hr incubation.

The initial concentrations of glucose were: A, 100 mM (1.8%); B, 50 mM (0.9%); C, 25 mM (0.45%); D, 10 mM (0.18%); E, 5 mM (0.09%).

Table 3-5. Composition of laminariorigosaccharides formed

D.P.	Tube No. 1	2	3	4	5
1	46	13	1.7	0	0
2	21	12	3.0	0.13	0.10
3	9.2	7.9	3.7	0.47	0.09
4	4.4	4.9	3.5	0.85	0.22
5	2.2	2.9	2.9	1.3	0.35
6	1.1	1.7	2.4	1.7	0.66
7	0.51	0.84	1.4	1.6	0.79
8	0.13	0.38	0.67	1.1	0.66
9	0.02	0.13	0.27	0.71	0.53
10	0	0	0.06	0.51	0.55
11	0	0	0	0.34	0.60
12	0	0	0	0.15	0.46
13	0	0	0	0	0.18
14	0	0	0	0	0.14
15	0	0	0	0	0
M_N	316	441	677	1094	1372
M_W	439	600	826	1207	1517
V	1.4	1.4	1.2	1.1	1.1

Values are given in m$\underline{\underline{M}}$.

Ⅲ-4-4.考察

E. gracilis Z菌体抽出液を利用することにより、ラミナリオリゴ糖を一段で容易に合成する方法を開発した。基質の初濃度比を変化させることのみによって、合成されるラミナリオリゴ糖の平均重合度を変化させることが可能であった。これは、理論的にはグルコースの分子数が得られるラミナリオリゴ糖の分子数に相当し、G-1-Pの分子数が、ラミナリオリゴ糖の重量に相当するためGlc/G-1-Pの小さいものほど1分子あたりの重量が大きくなるためであると考えられる。

Glc/G-1-P＝1/20の系において、数平均分子量8.4を達成し、最高14糖までのラミナリオリゴ糖の生成が確認された。通常の多糖の分解によるオリゴ糖の調製

法では重合度の高いオリゴ糖を得ることは難しい。本研究の方法は高重合度のラミナリオリゴ糖の効率的生産を可能にした点で意義が大きい。

生成したラミナリオリゴ糖の不均一度を計算したところ、Glc/G-1-Pに関わらず大きな差はみられなかった。この結果、ここに示した方法では平均重合度の異なるラミナリオリゴ糖を合成することは可能であるが、分子量分散を変化させることはできないことを示唆している。また本研究の方法により重合度一定のラミナリオリゴ糖のみを合成することはできないので、このようなものが必要な場合には適宜カラム分離を行う必要がある。

ここに示した反応の原料基質として用いるG-1-Pは現状では試薬レベルとしてのみ得ることができる。しかしながらG-1-Pは澱粉を原料としてホスホリラーゼを作用させる[109]あるいはスクロースを原料としてスクロースホスホリラーゼを作用させる[29]ことにより容易に調製することができる。またG-1-P供給系との組み合わせ反応、例えばスクロース－スクロースホスホリラーゼ系と本実験系を組み合わせた系，すなわちスクロースとグルコースを出発原料としスクロースホスホリラーゼと*E. gracilis*菌体抽出液を触媒量のリン酸の存在下に作用させることによる合成系，を確立すれば、ラミナリオリゴ糖のより経済的な合成法が確立されると考えられる。

Ⅲ－5．二糖類加リン酸分解酵素生成物を利用したキシラナーゼの性質の解析

Ⅲ-5-1.序

*Cellvibrio gilvus*はHulcherらによりウシ糞中より単離されたセルラーゼを生産するバクテリアであり[47]、その生産するセルラーゼ系は、セルロースの分解産物としてセロビオースを蓄積する特徴を有する[119,133]。*C. gilvus*は、グルコースをほとんど資化せず、セロビオースをよく資化し、また菌体内にセロビオースホスホリラーゼを持つことが示された[39]。そのセルラーゼ系に関しては1950年代に研究が行われており、アノマー反転型のセルラーゼの存在などが示唆されてきた[119]。

1980年代以降Sasakiらによりこの菌の酵素系について再び研究が行われ、セロビオースホスホリラーゼの精製[53,54]，本菌のセルラーゼを用いたセロビオースの調製[72,120]，セルラーゼ系酵素のクローニング[134,135]などが行われてきた。また本菌はセロビオースを蓄積するセルラーゼ系を持つことから、この系の中にセルロースの非還元末端側からセロビオース単位で水解を行う酵素であるセロビオヒドロラーゼの存在が推定された[119,133]。

HagaらはC. *gilvus*のセルラーゼ系からセロビオヒドロラーゼの取得を目的として、*p*-ニトロフェニル-β-セロビオシド(G_2-pNP)を切断する酵素を精製した[136]。しかしながら精製された酵素はアビセル，酸処理セルロース，カルボキシメチルセルロース，セロオリゴ糖などのセルロース系基質を全く切断しないが、キシランをG_2-pNPの6倍の速度で加水分解することから、キシラナーゼであると結論された。この酵素の基質特異性は詳しく調べられ、*p*-ニトロフェニルセロオリゴ糖（重合度２～５）(G_n-pNP)のアグリコン結合のみを水解すること、G_2-pNPをキシラン水解の約17%の速度で分解すること、G_2-pNPとキシランとを酵素上の同一サイトで切断することなどが判明した。G_2-pNPを切断するキシラナーゼはほかにもいくつか知られている[137-139]。しかしながらそれらの酵素はすべてクローニングされ*Escherichia coli*で発現された組換キシラナーゼであり、組換酵素以外ではこのような酵素は知られていなかった。しかもこれらの組換酵素のG_2-pNPを切断

する仕組みのモデルは提出されていない。そこで本研究は天然型のキシラナーゼのG_2-pNP切断活性を検索するとともにG_2-pNP切断のメカニズムを解明することを目的とした。

Ⅲ－1において、セロビオースホスホリラーゼの逆反応を利用した、β－グルコシルキシロース(GX)の合成を報告した。GXは、セロビオースとキシロビオースの中間的な構造をした化合物である。GXおよびキシロビオースのp-ニトロフェニル-β-グリコシドを合成し、*C. gilvus*キシラナーゼの作用を調べれば、G_2-pNP切断メカニズムの推定に役立つデータが得られることが期待される。そこで本研究においては、これらの合成基質に対する*C. gilvus*キシラナーゼの作用を調べるとともに他のキシラナーゼについても比較のために同様の実験を行った。

Ⅲ-5-2.方法

酵素

*C. gilvus*のキシラナーゼ(XCEL)は、Hagaらの方法[139]により精製した。*Streptomyces olivaceoviridis* E-86のキシラナーゼ(XSTR)は日下部らの方法[140,141]により、*Aspergillus japonicus*のキシラナーゼ(XASP)は山田らの方法[142]により、*Robillarda* sp. Y-20のキシラナーゼⅠ(XROB)はKoyamaらの方法[143]により精製して用いた。これらの酵素はすべてpNP-X及びキシロビオースをほとんど切断せず、キシロトリオースをわずかにしか切断しない典型的なエンドキシラナーゼとして報告されている。これらの酵素の基本的性質をTable 3-6にまとめた。

Table 3-6. List of xylanases used in this study

Xylanase	Origin	M.W.	pI	Specific activity (U/mg, using xylan)
XCEL	bacterium	40,000	5.0	42
XSTR	actinomycetes	40,500	7.3	24
XASP	fungi	26,000	9.1	124
XROB	fungi	17,600	9.7	226

酵素反応は37℃において以下の緩衝液中で行った。XCEL, 10 mM リン酸緩衝液(pH 6.5)；XSTR, XASP, 10 mM クエン酸緩衝液(pH 5.7)；XROB, 10 mM 酢酸緩衝液(pH 5.0)。

基質

p-ニトロフェニル-β-D-セロビオシド(G_2-pNP), 4-メチルウンベリフェリル-β-D-セロビオシド(G_2-4MU), キシラン(oat-spelt)は、Sigmaより購入した。*p*-ニトロフェニル-β-D-セロトリオシド(G_3-pNP), -セロテトラオシド(G_4-pNP), -セロペンタオシド(G_5-pNP)は焼津水産化学製のものを用いた。キシロビオース(X_2)は東和化成（東京）より購入した。4-*O*-β-D-Glucopyranosyl-D-xylose(GX)は、Ⅲ－1に記載した方法で合成した。*o*-ニトロフェニル-β-D-セロビオシド(G_2-oNP), *p*-ニトロフェニル-β-D-キシロビオシド(X_2-pNP), *p*-ニトロフェニル-4-*O*-β-D-glucopyranosyl-xylopyranoside(GX-pNP)は、アセチル化[144], 臭素化[145], Koenigs-Knorr反応[146], 脱アセチル化[147]の過程を経て合成した。

活性測定

キシラナーゼ活性は0.5%キシランを基質としたときの還元力の増加により測定した。キシラナーゼ活性1 Uは、Somogyi[87]-Nelson[88]法を用いて1 μmol/minのキシロビオースに相当する還元力を生成する酵素量として定義した。アリルグリコシドに対する活性は、フェノール化合物の遊離速度として測定した。各フェノール化合物は、反応液に2倍量の1 M 炭酸水素ナトリウムを加えたアルカリ条件下において以下の波長で分光光度計を用いて測定した。*p*-ニトロフェノール(pNP), 400 nm；*o*-ニトロフェノール(oNP), 400 nm；4-メチルウンベリフェロン(4MU), 357 nm。速度パラメータはⅡ－1に記載のProgram 1を用いて計算した。

Ⅲ-5-3. 結果

XCELの基質特異性

各種の基質に対するXCELの反応速度パラメータをキシランに対するV_{max}を100と

してTable 3-7にまとめた。XCELは、Table 3-7中に示したすべてのアリルグリコシドを、アグリコン結合でのみ切断した。3つのアリルセロビオシドに対するK_m(0.49～0.87 mM)およびV_{max}(23～33)値は互いに近い値を示した。この結果は、XCELはアリルセロビオシドのアグリコン結合だけをアリル基に関わらずに切断していることを示している。

Table 3-7. Kinetic parameters of XCEL toward various substrates

Substrate	K_m (mM)	V_{max}	k_0 (s^{-1})	k_0/K_m ($s^{-1}M^{-1}$)
Xylan	0.06±0.03%	100±6	28	
G_2-pNP	0.51±0.06	23±2	6.4	1.3×10^4
G_2-oNP	0.87±0.04	29±1	8.4	8.8×10^3
G_2-4MU	0.49±0.02	33±1	8.4	2.0×10^4
G_3-pNP	0.31±0.01	22±1	6.2	2.6×10^4
G_4-pNP	0.23±0.01	21±3	5.9	1.3×10^4
G_5-pNP	0.47±0.03	21±1	5.9	1.3×10^4
GX-pNP	0.06±0.01	100±1	28	4.7×10^5
X_2-pNP	0.17±0.02	133±5	37	2.2×10^5

V_{max} for xylan is defined as 100.

G_n-pNP(n=2～5)に対する速度パラメータもnに関わらずほぼ同じ値を示した。しかしながら本酵素は*p*-ニトロフェニル-β-D-グルコシドをほとんど切断しないことが報告されている。ここで得られた結果は、XCELはG_n-pNPをnが2以上の場合には重合度に関わらずにそのアグリコン結合を切断することを示している。すなわち本酵素の基質認識において、切断位置の非還元末端側2残基が重要な役割を果たしていることが推定される。

XCELはX_2-pNPおよびGX-pNPも切断した。これらの基質に対する速度パラメータはG_2-pNPと比較してK_mは非常に小さい値であり、V_{max}は大きい値を示した。この結果は、XCELがセルロース系の基質よりもむしろキシラン系の基質をよく認識していることを示しており、XCELがセロビオヒドロラーゼではなくキシラナーゼであることを強く示唆している。これらの基質に対するV_{max}値はキシランに対する値よりもむしろ大きかった。

各種キシラナーゼのG_2-pNPに対する作用

組換体でないキシラナーゼであるXCEL, XSTR, XASP, XROBの1 mM G_2-pNPに対する作用をTable 3-8にまとめた。XCELはキシランに対する速度の約17%でG_2-pNPを切断した。XSTRとXASPもG_2-pNPのアグリコン結合のみを切断したが、それらのキシラン切断活性に対しておよそ1%程度と微弱であった。XROBはG_2-pNPを全く切断しなかった。

Table 3-8. Activity toward 1mM G_2-pNP of various xylanases

Origin	Activity toward G_2-pNP
Non-recombinant	
Cellvibrio gilvus (XCEL)	17
Streptomyces olivaceoviridis (XSTR)	0.4
Aspergillus japonicus (XASP)	1.1
Robillarda sp. (XROB)	0
Recombinant	
Pseudomonas fluoresens	0.25
Caldocellum saccharolyticum	0.4
Clostridium thermocellum (*XynZ*)	8.1

Activity for xylan of each enzyme is defined as 100.

3つの組換キシラナーゼがG_2-pNPを切断することがすでに報告されている。報告されたG_2-pNP切断速度をTable 3-8に示した。*Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa*[137]および*Caldocellum saccharolyticum*[138]由来の酵素はキシラン分解速度の1%以下であり、*Clostridium thermocellum* xylanase Z (*XynZ*)[139]は8.7%の速度でG_2-pNPを分解する。組換酵素を加えてもXCELが最も速い速度でG2-pNPを分解した。

キシラナーゼの合成基質に対する速度パラメータ

4つの組換体でないキシラナーゼ(XCEL,XSTR, XASP, XROB)のキシラン, G_2-pNP, GX-pNP, X_3-pNPに対する速度パラメータをTable 3-9にまとめた。すべてのアリルグリコシド切断においてアグリコン結合以外の切断は観察されなかった。

Table 3-9. Kinetic parameters of the four xylanases toward xylan and the three *p*-nitrophenyl-glycosides

		Xylan	G_2-pNP	GX-pNP	X_2-pNP
XCEL	K_m	0.06±0.03%	0.51±0.06 mM	0.06±0.01 mM	0.13±0.02 mM
	V_{max}	100±6	23±2	100±1	133±5
XSTR	K_m	0.06±0.01%	44±6 mM	3.2±0.3 mM	1.6±0.1 mM
	V_{max}	100±2	18±2	200±12	360±9
XASP	K_m	0.13±0.07%	50±3 mM	3.1±0.2 mM	1.4±0.1 mM
	V_{max}	100±18	43±1	100±3	155±4
XROB	K_m	0.09±0.02%	n.d.	30±24 mM	15±3 mM
	V_{max}	100±6		0.1±0.5	4.7±0.5

V_{max} for xylan of each enzyme is defined as 100.

XROB以外の3者ではX_2-pNPおよびGX-pNPに対するV_{max}がキシランに対するV_{max}よりも大きかった。これらのX_2-pNPに対するV_{max}はGX-pNPに対するV_{max}よりも1.3～1.8倍の値を示した。

XCELのX_2-pNPに対するK_mはXSTR, XASPのK_mに対して一桁小さい値を示した。XCELのGX-pNPに対するK_m(0.06 mM)はX_2-pNPに対するK_m(0.13 mM)の約1/2の値を示した。この結果はXSTR, XASPではGX-pNPに対するK_mがX_2-pNPに対するK_mの約2倍の値を示す結果と異なっていた。

XSTR(18)とXASP(43)のG_2-pNPに対するV_{max}は、1 mM G_2-pNPの切断速度がXCELと比較して非常に小さいにも関わらずXCEL(23)の場合と比較的近い値に計算された。これらのK_m(44, 50 mM)はXCEL(0.51 mM)と比べて二桁大きい値を示した。XROBはG_2-pNPを全く切断しなかった。

Ⅲ-5-4. 考察

本研究において新たに調べた組換体でないエンドキシラナーゼ3例の内2つ(XSTR, XASP)までがG_2-pNPを切断することが判明した。この結果はほかの多くの組換体ではないキシラナーゼがG_2-pNPを切断することを示唆しており、G_2-pNP

切断が組換酵素特有の現象でないことを示している。

XCELは、1 mMの濃度のG_2-pNPをほかの2つのキシラナーゼと比較して非常に速い速度で切断するが、そのV_{max}値は必ずしも大きくなかった。XASPのV_{max}値はXCELの値よりもむしろ大きく計算された。この事実はXCELの観測される強いG_2-pNP切断活性は小さいK_mによるものであることを示している。XCELのK_mはXSTR, XASPの値と比較して2桁小さく計算された。

X_2-pNPに対するK_m値を比較すると、XCELの値はXSTR, XASPの値に比べて1桁小さい数値を示した。しかしながらこれら3者のキシランに対するK_mは近似した値(0.06～0.13%)を示した。また、XCELのX_2-pNPとGX-pNPに対するK_mを比較するとGX-pNPに対する値の方が小さかった。この結果はXSTR, XASPとは異なっていた。これらの結果はXCELの強いG_2-pNP切断活性の機構を推定するための有用な情報となる。そこで、これらの結果を説明するためにFig. 3-12に示したサブサイトを仮定した。

サブサイト1は切断位置の還元末端側のサイトである。XCELのサブサイト1は、アリル基に対して強い親和性を持つ。XSTR, XASPのサブサイト1はアリル基を受け入れることは可能であるがXCELほどは親和性が強くない。これはキシランに対する親和性が近いにも関わらず、X_2-pNPに対するK_m値が大きく異なることから推定される。XCELは、キシランは切断するもののセロオリゴ糖あるいはセルロースを全く切断しないことから、XCELのサブサイト1はキシロシル基を受け入れることができるがグルコシル基を受け入れることができないことを示している。XCELはキシロトリオースを非常に遅くしか切断しないため、XCELのサブサイト1のキシロシル基に対する親和性は、アリル基に対する親和性よりも小さいと考えられる。

サブサイト2は切断位置の非還元末端側のサイトである。G_2-pNPとGX-pNPに対するK_m値を比較すると、XCEL, XSTR, XASP3者のサブサイト2はキシロシル基の代わりにグルコシル基を受け入れることができるが親和性は小さいことが推定される。

サブサイト3は切断位置から一つ非還元末端寄りのサイトである。X_2-pNPとGX-pNPに対するK_m値の比較から、XSTR, XASPのサブサイト3はグルコシル基よりもキシロシル基に対してより大きい親和性を示すと考えられる。しかしながらXCELは

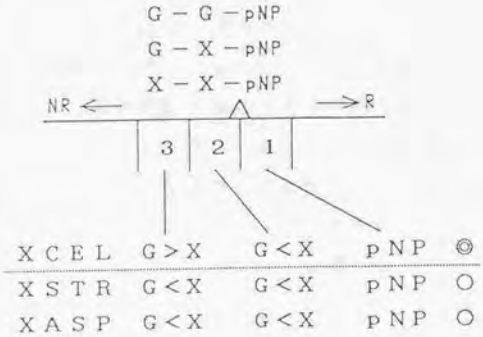


Fig. 3-12. A supposed subsite model of xylanase.

R, Reducing end; NR, non-reducing end.

GX-pNPに対するK_mがX_2-pNPに対するK_mよりも小さな値を示すため、XCELのサブサイト3の親和性はむしろグルコシル基の方に強いことが示唆される。

ここまでの結果を総合すると、サブサイト1のアリル基に対する強い親和性とサブサイト3のグルコシル基に対する強い親和性のためにXCELはG_2-pNPに対して小さなK_m値を示すと考えられる。G_2-pNP分解活性測定の実験は通常1 mM程度の濃度で行われることが多い。XCELのG_2-pNPに対するK_mは0.51 mMであり、1 mMより十分小さな値である。これがXCELがG_2-pNPに対して強い活性を示した理由であると考えられる。XSTR, XASPのK_mは1 mMよりもはるかに大きく、G_2-pNPの溶解度よりもむしろ大きな数値を示した。このため、XSTRとXASPのG_2-pNP切断活性は小さな値として観測される。

XCELの基質特異性は*XynZ*に類似している。*XynZ*は、G_2-pNPとX_2-pNPをそれぞれ13.4 U/mg, 340 U/mgの速度で切断するが、セロオリゴ糖を切断する活性はないと報告されている[139]。しかしながら*XynZ*のこれらの基質に対するK_m値は報告されていないためXCELとの厳密な比較はできない。近年*Cellulomonas fimi*由来の*E. coli*による組換酵素CexがG_2-pNPおよびX_2-pNPの両者を切断すると報告されている[148]。本酵素はキシラナーゼ活性を持った、エキソ型のβ-1,4-グルカナーゼとして最初に報告された[149]。Cexは、XCELと似たK_mおよび触媒効率(k_0/K_m)を示す(G_2-pNP, K_m = 0.80 mM, k_0/K_m = 4.9×10^3 $s^{-1}M^{-1}$; X_2-pNP, K_m = 0.13 mM, k_0/K_m = 2.4×10^5 $s^{-1}M^{-1}$)[148]。しかしながらCexはXCEL, *XynZ*とは異なり、カルボキシメチルセルロースを切断する活性を持つと報告されている[148, 149]。

本研究で得られた結果はキシラナーゼにはX_2-pNP, GX-pNPに対する作用性の違いにより二種類のタイプに分類できる可能性を示唆している。すなわち、これらの基質をキシランと同程度以上に分解するもの(XCEL, XSTR, XASP), およびあまり分解しないもの(XROB)の二種類である。前者はG_2-pNPを分解するが後者はしない。最近Gilkesらはβ-1,4-グリカナーゼ（セルラーゼとキシラナーゼ）をそのアミノ酸配列の疎水性クラスター分析[150]により9つの族に分類した[151]。その分類によればほとんどのキシラナーゼは、FあるいはG族に分類される[151]。この族間の酵素化学的性質の関係は興味の持たれるところである。今回の研究に用いた4種のキシラナーゼはアミノ酸配列が知られていないため、今回の分類とGilkesらの分類[151]とを直接比較することはできない。しかしながらG_2-pNPを切断す

ると報告されている組換キシラナーゼは，すべてF族に属している[137-139, 148-154]。G族の酵素のX_2-pNPに対しての高い活性あるいはG_2- pNPの切断は現在まで全く報告されていない。今回の研究により発見されたキシラナーゼの基質に対する作用による分類はアミノ酸配列による分類と一致する可能性がある。この点に関しては今後の研究が待たれる。

今回の研究において、使用したすべてのキシラナーゼがX_2-pNPを切断した。また現在までにX_2-pNPを切断しないと報告されているキシラナーゼはない。この事実は、すべてのキシラナーゼ活性がX_2-pNPを用いて検出可能であることを示唆している。ほとんどの場合キシラナーゼ活性はキシランを基質として測定される。しかしながら、異なるキシラン標品を用いて測定したキシラナーゼ活性は、キシランの組成がその起源，調製法，ロットによってばらつきがあるために互いに比較することが難しい。またキシランは不溶性ポリマーであるために反応は不均一系で行うことになり、また反応速度解析が非常に行い難いことになる。そのため確定した構造を持つ水溶性低分子のキシラナーゼ活性測定用基質の開発はキシラナーゼ研究のために重要な意味を持つことになる。今回の研究でX_2-pNPがこの目的に合致する基質であることが判明した。遊離するpNPの量はアルカリ条件下分光光度計を用いて、簡便かつ高感度に測定することができる。この場合反応が均一系で行われるため、反応速度論的解析も容易である。本研究の結果に基づき著者は比較を容易かつ確実にするために、キシラナーゼ活性測定はキシランを基質として測定するとともにX_2-pNPを基質としたときの速度パラメータの測定を併せて行うべきであることを提案する。

Ⅲ－8．要約

セロビオースホスホリラーゼを含んだ*Cellvibrio gilvus*菌体を用いたグルコシル－キシロース（ＧＸ）の合成法について検討した。菌体をアセトン処理した後にエタノール処理を施すことにより混在しているホスホグルコムターゼ活性を選択的に除去することができた。アセトン－エタノール処理菌体を固定化セロビオースホスホリラーゼとして用いると、G-1-Pとキシロースから60%の変換率でＧＸが生成した。活性炭カラムを用いてＧＸを単離し構造決定を行った。酵素分解，メチル化分析，FAB-MASS，^{1}H-NMR，^{13}C-NMRなどの方法によりＧＸの構造を4-*O*-β-D-glucopyranosyl-D-xyloseと決定した。ＧＸはセロビオースとキシロビオースの中間的な構造であり、その性質も両者の中間的なものであった。

スクロースを原料としたセロビオースの合成法を検討した。スクロースに触媒量のリン酸の存在下スクロースホスホリラーゼ，キシロースイソメラーゼ，セロビオースホスホリラーゼの三酵素を同時に作用させることによりセロビオースを一段階で合成することができた。セロビオースの反応収率は76%であった。活性炭カラムを用いてセロビオースを単離して最終的に42%の収率で結晶セロビオースを得た。原料のスクロースが安価であり収率が高いことも確認できたため、本方法は工業的なセロビオース生産法に用いることが可能であると考えられる。

スクロースを原料としたラミナリビオースの合成法を検討した。スクロースに触媒量のリン酸の存在下スクロースホスホリラーゼ，キシロースイソメラーゼ，ラミナリビオースホスホリラーゼの三酵素を同時に作用させることによりラミナリビオースを一段階で合成することができた。ラミナリビオースの反応収率は55%であり、11%のモル収率でラミナリトリオースが副生成した。セロビオース合成時にはみられなかった三糖の生成は酵素の特異性の違いによると考えられた。生成したラミナリビオースを単離して^{13}C-NMRで構造を確認した。

ラミナリビオースホスホリラーゼとβ-1,3-オリゴグルカンホスホリラーゼを含んだ*Euglena gracilis* Z菌体抽出液を触媒としてG-1-Pとグルコースから種々の平均重合度を持ったラミナリオリゴ糖混合物を合成した。G-1-Pとグルコースの初濃度比を変化させることにより合成されるラミナリオリゴ糖の平均重合度が変化した。G-1-P／グルコースが１の場合糖組成は重合度１～９であり平均重合度は1.8であったが、この比が２０の場合は重合度２～１４であり平均重合度は8.4であった。本方法によれば従来得ることの難しい１０糖以上のラミナリオリゴ糖を合成することも可能であった。

セロビオースホスホリラーゼを用いて合成したＧＸを利用してキシラナーゼの反応解析を行った。*C. gilvus*のキシラナーゼはキシランの他にG_2-pNPを加水分解することが知られていた。X_2-pNPとGX-pNPを合成し、G_2-pNPとともに４種類のキシラナーゼに対する作用を調べた。その結果、*C. gilvus*キシラナーゼの強いG_2-pNP切断活性は、低いK_mのために観測されることがわかった。K_mの低い理由を切断位置の還元末端側サブサイトのアリル基に対する親和性および切断位置の一つ非還元末端よりのサブサイトのグルコースに対する親和性が高いためであると推定した。またキシラナーゼはX_2-pNP,GX-pNPに対する反応性の違いから二つに分類できる可能性が示された。本研究による分類法とアミノ酸配列による分類法に関しての考察を行った。

Ⅳ. 結論

本研究では二糖類加リン酸分解酵素について、酵素を精製して性質を調べることにより酵素反応機構に対する考察を行うとともにその新規な利用法を開発することを目的とした。

二糖類加リン酸分解酵素の精製と性質に関しては以下のような知見が得られた。

*Cellvibrio gilvus*のセロビオースホスホリラーゼを精製し、酵素化学的諸性質を明らかにした[155]。反応速度論的解析によりセロビオースホスホリラーゼの反応機構をordered bi bi機構と決定した。また逆反応におけるアクセプターの基質特異性を明らかにした[156]。アクセプター分子のアノマー特異性を疑似糖を用いることにより解析し、β－アノマーを特異的に認識していることを証明した[157]。逆反応におけるグルコースによる基質阻害現象を解析し、拮抗基質阻害であるとの結論を得た[156]。

*Euglena gracilis Z*の菌体抽出液よりラミナリビオースホスホリラーゼを精製し、酵素化学的諸性質を明らかにした[158]。その結果等電点のわずかに異なる3つの酵素蛋白が存在することが判明した。これらの蛋白はゲル濾過，SDS-PAGEでは全く区別できず、抗体を用いた免疫的な方法でも区別することができなかった。また基質特異性などにもほとんど差は見られなかった。他の*E. gracilis*菌株のラミナリビオースホスホリラーゼはこのような多型性は示さなかった。反応機構はordered bi bi機構であると決定された。アクセプターとしてグルコース以外に各種のβ－グルコシドを利用することを明らかにした。逆反応における拮抗基質阻害現象がみられ、セロビオースホスホリラーゼの反応解析で用いたモデルを使用することによりこの現象を説明することができた。

本研究により5種類の二糖類加リン酸分解酵素のうち4種類までその反応機構が解明された。反応機構と反応前後のアノマー反転の有無に密接な関係があり、アノマー保持型の酵素はping pong機構，アノマー反転型の酵素はsequential機構により反応が起きていることが示唆された。二糖類加リン酸分解酵素と加水分解酵素の反応機構についての考察を行い、両者のアノマー反転の有無と反応機構と

の関係が似ていることを指摘した。

二糖類加リン酸分解酵素の利用に関しては以下のような知見が得られた。

*C. gilvus*の培養菌体から抽出すること無しにセロビオースホスホリラーゼを利用する方法を確立し、その処理菌体を用いたグルコシルキシロース（ＧＸ）の合成法を確立した[159]。合成されたＧＸはセロビオースとキシロビオースとの中間的な構造であった。

セロビオースホスホリラーゼ，キシロースイソメラーゼ，スクロースホスホリラーゼの反応を組み合わせて行うことによるスクロースからの一段階のセロビオース合成法を開発した[160]。この方法を用いればスクロースから75%の収率でセロビオースを合成することができることを実証した。

ラミナリビオースホスホリラーゼ，キシロースイソメラーゼ，スクロースホスホリラーゼの反応を組み合わせて行うことによるスクロースからの一段階のラミナリビオース合成法を開発した[161]。この場合セロビオース合成の場合と異なり酵素の特異性の問題からラミナリトリオースが副生成した。この方法によりスクロースから約55%の収率でラミナリビオースを合成することができることを実証した。

ラミナリビオースホスホリラーゼとβ-1,3-オリゴグルカンホスホリラーゼを含んだ*E. gracilis* Z菌体抽出液を触媒として、グルコースとグルコース－１－リン酸からさまざまな平均重合度を持ったラミナリオリゴ糖混合物を合成する方法を開発した[162]。平均重合度は基質の初期濃度比を変化させることにより制御できた。

キシロビオースおよびセロビオースホスホリラーゼを利用して合成したＧＸのp-ニトロフェニル誘導体を合成し、これらを用いて*C. gilvus*のp-ニトロフェニルセロビオシドを切断するキシラナーゼおよび他の３種のキシラナーゼの基質認識機構の解析を行った[163]。４種の酵素の基質認識機構をサブサイトモデルを用いて推定するとともに、これらのグリコシドのキシラナーゼ基質としての有用性を証明した。

以上のように本研究により二糖類加リン酸分解酵素の性質および利用について

多くの新たな知見が得られた。本研究の成果を基にして、今後の二糖類加リン酸分解酵素に関する研究は次のような課題が残されていると考えられる。

酵素の精製と性質に関して、唯一酵素化学的性質および反応機構の解明されていないトレハロースホスホリラーゼに関する研究が必要である。また二糖類加リン酸分解酵素のうち、遺伝子がクローニングされアミノ酸配列が調べられた酵素はスクロースホスホリラーゼ[18,22]のみである。他の酵素についての遺伝子クローニングを行いアミノ酸配列を調べることが二糖類加リン酸分解酵素の酵素化学的性質を調べる上で今後の重要な研究テーマとして残されている。また本研究において二糖類加リン酸分解酵素が各種のオリゴ糖の工業的合成に関して有用な酵素であることが示された。今後は酵素の大量生産についての研究（培養条件検討あるいは遺伝子操作法）が二糖類加リン酸分解酵素の工業的利用を図る上で重要な課題となる。

今後の二糖類加リン酸分解酵素の研究の発展を期待しつつ本研究の結びとする。

文献

1) 中村道徳（監修）；アミラーゼ，学会出版センター，東京（1986）
2) 中村道徳，貝沼圭二（編）：澱粉・関連糖質酵素実験法，学会出版センター，東京（1989）
3) 日高秀昌，平山匡男；低カロリーオリゴ糖周辺の話題．，バイオサイエンスとバイオインダストリー，46，3837-3842（1988）
4) 丸尾文治，田宮信雄（編）：酵素ハンドブック，朝倉書店，東京（1982）
5) *Enzyme nomenclature, Recommendations (1978) of the Nomenclature Commitee of the International Union of Biochemistry*, Academic press, New York (1979)
6) W. W. Cleland; The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products., *Biochim. Biophys. Acta.*, 67, 104-137 (1963)
7) D. J. Graves, J. H. Wang; α-Glucan phosphorylases., in *The enzymes 3rd edn.*, ed. by P. D. Boyer, Academic press, New York (1972) vol. 7, pp. 435-482
8) B. O. Kagan, S. N. Lakter, and E. M. Zfasman; Phosphorolysis of sucrose by cultures of *Leuconostoc mesenteroides.*, *Biokhimiya*, 7, 93-108 (1942)
9) M. Doudoroff, N. Kaplan and W. Z. Hassid; Phosphorolysis and synthesis of sucrose with a bacterial preparation., *J. Biol Chem.*, 148, 67-75 (1943)
10) M. Doudoroff; Studies on the phosphorolysis of sucrose., *J. Biol. Chem.*, 151, 351-361 (1943)
11) M. Doudoroff, J. M. Wiame, and H. Wolochow; Phosphorolysis of sucrose by *Pseudomonas putrefaciens.*, *J. Bacteriol.*, 57, 423-427 (1949)
12) R. Weinberg and M. Doudoroff; Studies with three bacterial sucrose phosphorylase., *J. Bacteriol.*, 68, 381-388 (1954)
13) M. Doudoroff, H. A. Barker, and W. Z. Hassid; Studies with bacterial sucrose phosphorylase. I. The mechanism of action of sucrose phosphorylase as a glucose-transferring enzyme (trans-glucosidase)., *J. Biol. Chem.*, 168, 725-732 (1947)
14) R. Silverstein, J. Voet, D. Reed, R. H. Abeles; Purification and mechanism of action of sucrose phosphorylase., *J. Biol. Chem.*, 242, 1338-1346 (1967)
15) M. Doudoroff, W. Z. Hassid, and H. A. Barker; Studies with bacterial sucrose phosphorylase. II. Enzymatic synthesis of a new reducing and a few non-reducing disaccharide., *J. Biol. Chem.*, 168, 733-746 (1947)
16) N. J. Palleroni and M. Doudoroff; Preparation and properties of D-rhamnulose (6-deoxy-D-fructose) and glucosyl rhamnuloside., *J. Biol. Chem.*, 219, 957-962 (1956)
17) J. G. Voet and R. H. Abeles; The mechanism of action of sucrose

phosphorylase., *J. Biol. Chem.*, 245, 1020-1031 (1970)
18) J. J. Mieyal, M. Simon, and R. H. Abeles; Mechanism of action of sucrose phosphorylase., *J. Biol. Chem.*, 247, 532-542 (1972)
19) A. M. Gold and M. P. Osber; α-Glucosyl fluoride: A substrate of sucrose phosphorulase., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 42, 469-474 (1971)
20) J. P. Robeson, R. G. Barletta, and R. Curtiss III; Expression of *Streptococcus mutans* glucosyltransferase gene in *Escherichia coli.*, *J. Bacteriol.*, 153, 211-221 (1983)
21) J. J. Ferretti, T.-T. Huang, and R. R. B. Russell; Sequence analysis of the glucosyltransferase A gene (*gtfA*) from *Streptococcus mutans* Ingbritt., *Innfect. Immun.*, 56, 1585-1588 (1988)
22) R. R. B. Russell, H. Mukasa, A. Shimamura, and J. J. Ferretti; *Streptococcus mutans gtfA* gene specifies sucrose phosphorylase., *Infect. Immun.*, 56, 2763-2765 (1988)
23) T. Koga, K. Nakamura, Y. Shirokane, K. Mizusawa, S. Kitao, and M. Kikuchi; Purification and some properties of sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides.*, *Agric. Biol. Chem.*, 55, 1805-1810 (1991)
24) S. Kitao and E. Nakano; Cloning of the sucrose phosphorylase gene from *Leuconostoc mesenteroides* and its overexpression using a 'sleeper' bacteriophage vector., *J. Ferment. Bioeng.*, 73, 179-184 (1992)
25) S. Kitao and H. Sekine; Transglucosylation catalyzed by sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides* and production of glucosyl-xylitol., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 2011-2014 (1992)
26) 北岡本光，谷口肇，佐々木堯；ホスホリラーゼ系酵素などの二基質反応における速度パラメータの計算法．－Taylor展開一次項を利用した最小自乗法の直接適用－．，日本澱粉学会平成２年度大会研究発表講演要旨集，pp. 21，講演番号29 (1990)
27) J. J. Mieyal; Sucrose phosphorylase from *Pseudomonas saccharophila.*, in *Methods in Enzymology*, ed. by V. Ginsburg, Academic Press, New York (1972), vol. 28, pp. 935-943
28) J. J. Mieyal and R. H. Abeles; Disaccharide phosphorylases., in *The enzymes, 3rd edn.*, ed. by P. D. Boyer, Academic Press, New York (1972), vol. 7, pp. 515-532
29) E. J. Vandamme, J. V. Loo, L. Machtelinckx, and A. De Laporte; Microbial sucrose phosphorylase: fermentation process, properties, and biotechnical applications., in *Advances in Applied Microbiology*, ed. by A. I. Laskin, Academic Press, New York (1987), vol. 32, pp. 163-201
30) C. Fitting and M. Doudoroff; Phosphorolysis of maltose by enzyme preparations from *Neisseria meningitidis.*, *J. Biol. Chem.*, 199, 153-163 (1952)
31) Z. Selinger and M. Schramm; Enzymatic synthesis of the maltose

analogues, glucosyl glucosamine, Glucosyl N-acetylglucosamine and glucosyl 2-deoxyglucose by an extract of *Neisseria perflava.*, *J. Biol. Chem.*, 236, 2183-2185 (1961)
32) B. J. B. Wood and C. Rainbow; The maltophosphorylase of beer lactobacilli., *Biochem. J.*, 78, 204-209 (1961)
33) A. Kamogawa, K. Yokobayashi, and T. Fukui; Purification and properties of maltose phosphorylase from *Lactobacillus brevis.*, *Agric. Biol. Chem.*, 37, 2813-2819 (1973)
34) Y. Tsumuraya, C. F. Brewer, and E. J. Hehre; Substrate induced activation of maltose phosphorylase: interaction with the anomeric hydroxyl group of α-maltose and α-D-glucose controls the enzyme's glucosyltransfer activity., *Arch. Biochem. Biophys.*, 281, 58-65 (1990)
35) C. J. Sih and R. H. McBee; A cellobiose phosphorylase in *Clostridium thermocellum.*, *Proc. Montana Acad. Sci.*, 15, 21-22 (1955)
36) C. J. Sih, N. M. Nelson, and R. H. McBee; Biological synthesis of cellobiose., *Science*, 126, 1116-1117 (1957)
37) W. A. Ayers; Phosphorylation of cellobiose and glucose by *Ruminococcus flavefaciens.*, *J. Bacteriol.*, 76, 515-517 (1958)
38) W. A. Ayers; Phosphorolysis and synthesis of cellobiose by cell extracts from *Ruminococcus flavefaciens.*, *J. Biol. Chem.*, 234, 2819-2822 (1959)
39) F. H. Hulcher and K. W. King; Metabolic basis for disaccharide preference in a *Cellvibrio.*, *J. Bacteriol.*, 76, 571-577 (1958)
40) M. Sato and H. Takahashi; Fermentation of C^{14}-labeled cellobiose by *Cellulomonas fimi.*, *Agric. Biol. Chem.*, 31, 470-474 (1967)
41) K.-L. Schimz, B. Rutten, and M. Tretter; Cellobiase from *Cellulomonas* spec. cleaves cellobiose by phosphorolysis., *Hoppe-Seyler's Phys. Chem.*, 360, 1191 (1979)
42) K.-L. Schimz, B. Broll, and B. John; Cellobiose phosphorylase (EC 2.4.1.20) of *Cellulomonas*: occurence, induction, and its role in cellobiose metabolism., *Arch. Microbiol.*, 135, 241-249 (1983)
43) A. Huttermann and C. Volger; Cellobiose phosphorylase in *Fomes annosus.*, *Nature New Biol.*, 245, 64, (1973)
44) 荒井基夫, 田中計実；セロビオースホスホリラーゼ及び製造法. , 特開平4-108380 (1992)
45) W. A. Ayers; Nutrition and physiology of *Ruminococcus flavefaciens.*, *J. Bacteriol.*, 76, 504-509 (1958)
46) F. H. Hulcher and K. W. King; Disaccharide prefference of an anaerobic cellulolytic bacterium, *Cellvibrio gilvus* N. sp., *J. Bacteriol.*, 76, 565-570 (1958)
47) K. Sheth and J. K. Alexander; Purification and properties of β-1,4 oligoglucan: orthophosphate glucosyltransferase from *Clostridium thermocellum.*, *J. Biol. Chem.*, 244, 457-464 (1969)
48) J. K. Alexander; Cellodextrin phosphorylase from *Clostridium*

thermocellum., in *Methods in Enzymology*, ed. by V. Ginsburg, Academic Press, New York (1972), vol. 28, pp. 948-953
49) J. K. Alexander; Purification and specificity of cellobiose phosphorylase from *Clostridium thermocellum.*, *J. Biol. Chem.*, 243, 2899-2904 (1968)
50) J. K. Alexander; Cellobiose phosphorylase from *Clostridium thermocellum.*, In *Methods in Enzymology*, ed. by V. Ginsburg, Academic Press, New York (1972), vol. 28, pp. 944-948
51) J. K. Alexander; Synthesis of 4-*O*-β-D-Glucopyranosyl-D-xylose, 4-*O*-β-D-glucopyranosyl-D-arabinose, 4-*O*-β-D-glucopyranosyl-2-deoxy-D-glucose, 4-*O*-β-D-glucopyranosyl-D-mannose, 4-*O*-β-D-glucopyranosyl-D-glucosamine by cellobiose phosphorylase from *Clostridium thermocellum.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 123, 240-246 (1968)
52) K.-L. Schimz and G. Decker; Cellobiose phosphorylase (EC 2.4.1.20) of *Cellulomonas* sp.: investigations on its localization., *Can. J. Microbiol.*, 31, 751-754 (1985)
53) T. Sasaki., T. Tanaka., S. Nakagawa, and K. Kainuma; Purification and properties of *Cellvibrio gilvus* cellobiose phosphorylase., *Biochem. J.*, 209, 803-807 (1983)
54) T.Sasaki; Cellobiose phosphorylase from Cellvibrio gilvus., in *Methods in Enzymology*, ed. by W. A. Wood and S. T. Kellog, Academic Press, New York (1988), vol. 160, pp. 468-472
55) 田中計実，荒井基夫；好気性菌#531株の生産するセロビオースホスホリラーゼの精製と諸性質．，日本農芸化学会1990年度大会講演要旨集，3Bp13 (1990)
56) 田中計実，川口剛司，荒井基夫；*Clostridium thermocellum*の生産するセロビオースホスホリラーゼの精製と諸性質．，日本農芸化学会1991年度大会講演要旨集，3Wa14 (1991)
57) S. H. Goldemberg, L. R. Marechal, and B. C. De Souza; β-1,3-Oligoglucan: orthophosphate glucosyltransferase from *Euglena gracilis.*, *J. Biol. Chem.*, 241, 45-50 (1966)
58) D. J. Manners and D. C. Tatlor; Studies on carbohydrate metabolizing enzymes. XVI. Specificity of laminaribiose phosphorylase from *Astasia ocellata.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 121, 443-451 (1967)
59) 北岡正三郎（編）；ユーグレナ，学会出版センター，東京 (1989)
60) L. R. Marechal; β-1,3-Oligoglucan; orthophosphate glucosyltransferases from *Euglena gracilis*. II. Comparative studies between laminaribiose and β-1,3-oligoglucan phosphorylase., *Biochim. Biophys. Acta*, 146, 431-442 (1967)
61) S. H. Goldemberg and L. R. Marechal; Laminaribiose phosphorylase and β-1,3-oligoglucan phosphorylase from *Euglena gracilis.*, in *Methods in Enzymology*, ed. by V. Ginsburg, Academic Press, New York (1972), vol. 28, pp. 953-960
62) L. R. Marechal; β-I,3-Oligoglucan; orthophosphate glucosyltransferases from *Euglena gracilis*. I. Isolation and some

properties of β-1,3-oligoglucan phosphorylase., *Biochim. Biophys. Acta*, 146, 417-430 (1967)
63) L. R. Marechal and E. Belocopitow; Metabolism of trehalose in *Euglena gracilis*., *J. Biol. Chem.*, 247, 3223-3228 (1972)
64) A. L. Lehninger; in *Biochemistry 2nd edn.*, Worth Publishers Inc., New York (1975), pp. 202-206
65) W. Z. Hassid, M. Doudoroff, A. L. Potter, and H. A. Barker; The structure of an enzymatically synthesized reducing disaccharide D-glucosido-L-arabinose., *J. Am. Chem. Soc.*, 70, 306-310 (1948)
66) P. R. Birnberg and M. L. Brenner; A one step enzymatic assay for sucrose with sucrose phosphorylase., *Anal. Biochem.*, 142, 556-561 (1984)
67) S. Daurat-Larroque, L. Hammar, and W. J. Whelan; Enzyme reactors for the continuous synthesis of sucrose from starch., *J. Appl. Biochem.*, 4, 133-152 (1982)
68) B. M. Chassy and M. I. Krichevsky; Synthesis of glucose 1-phosphate-U-^{14}C and specifically labeled sucrose using sucrose phosphorylase., *Anal. biochem.*, 49, 232-239 (1972)
69) A. Kamogawa, K. Yokobayashi, and T. Fukui; An enzymatic method for the determination of maltose in the presence of other oligosaccharides., *Anal. Biochem.*, 57, 303-305 (1974)
70) S. Murao, H. Nagano, S. Ogura, and T. Nishino; Enzymatic synthesis of trehalose from maltose., *Agric. Biol. Chem.*, 49, 2113-2118 (1985)
71) T. K. Ng and J. G. Zekius; Synthesis of [^{14}C]cellobiose with *Clostridium thermocellum* cellobiose phosphorylase., *Appl. Environment. Microbiol.*, 52, 902-904 (1986)
72) T. Sasaki and K. Kainuma; Bioconversion of cellulose to α-1,4-glucan., *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 18, 64-66 (1983)
73) 千葉誠哉；グルコアミラーゼとα－グルコシダーゼの比較．，澱粉科学，31, 55-66 (1984)
74) M. L. Sinnott; Catalytic mechanism of enzymic glycosyl transfer., *Chem. Rev.*, 90, 1171-1202 (1990)
75) 松尾勝；β－キシロシド分解酵素．，化学と生物，24, 632-635 (1986)
76) M. M. Bradford; A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding., *Anal. Biochem.*, 72, 248-254 (1976)
77) G. Mihael; D-Glucose 1-phosphate., in *Methods in enzymatic analysis. 2nd edn.*, ed. by H. U. Bergmyer, Academic Press, New York, (1974), vol. 4, pp. 185-191
78) J. Okuda, I. Miwa, K. Maeda, K. Tokui; Rapid and sensitive, colorimetric determination of the anomer of D-glucose with D-glucose oxidase, peroxidase, and mutarotase., *Carbohydr. Res.*, 58, 267-270 (1977)
79) O. H. Lowry and J. A. Lopez; The determination of inorganic phosphate in the presence of labile phosphate esters., *J. Biol. Chem.*,

162, 421-428 (1946)
80) B. J. Davis; Disk electrophoresis. (II). Method and apllication to human serum proteins., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 404-427 (1964)
81) T. S. Meyer and B. L. Lamberts; Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips., *Biochim. Biophys. Acta*, 107, 144-145 (1965)
82) U. K. Laemmli; Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4., *Nature*, 227, 680-685 (1970)
83) W. W. Cleland; Statistical analysis of enzyme kinetic data., in *Methods in Enzymology*, ed. by D. Purich, Academic Press, New York (1979), vol. 63, pp. 103-138
84) S. Ogawa, T. Toyokuni, T. Kondoh, Y. Hattori, S. Iwasaki, M. Suetsugu, and T. Suami; Pseudo-sugars. VII. Synthesis of pseudo-hezopyranose derivatives with α- and β-gluco configuration., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 54, 2739-2746 (1981)
85) S. Ogawa, Y. Tsukiboshi, Y. Iwasawa, and T. Suami; Synthesis of four new diastereoisomers of DL-5-hydroxymethyl-1,2,3,4-cyclohexanetetrol., *Carbohydr. Res.*, 136, 77-89 (1985)
86) S. Ogawa, Y. Iwasaka, T. Nose, T. Suami, S. Ohba, M. Ito, and Y. Saito; Total synthesis of (+)-(1,2,3/4,5)-2,3,4,5-tetrahydroxy-cyclohexane-1-methanol and (+)-(1,3/2,4,5)-5-amino-2,3,4-trihydroxy-cyclohexan-1-methanol [(+)-validamin]. *X*-Ray crystal structure of (3*S*)-(+)-2-exo-bromo-4,8-dioxatricyclo[4.2.1.$0^{3,7}$]nonan-5-one., *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, 903-906 (1985)
87) M. Somogyi; Notes on sugar determination., *J. Biol. Chem.*, 195, 19-23 (1952)
88) N. Nelson; A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose., *J. Biol. Chem.*, 153, 375-380 (1944)
89) S. Ogawa, I. Sugawa, Y. Shibata; Synthesis of pseudo-laminaribiose, -cellobiose, and -maltose (D-glucopyranosyl 5a-carba-D- and L-glucopyranoses)., *Carbohydr. Res.*, 211, 147-155 (1991)
90) J. O. Duus, K. Bock, and S. Ogawa; *Carbohydr. Res.*, (1993) *in press*
91) D. Keilin and E. F. Hartree; Specificity of glucose oxidase (notain)., *Biochem. J.*, 50, 331 (1952)
92) K. J. Schray and I. A. Rose; Anomeric specificity and mechanism of two pentose isomerases., *Biochemistry*, 10, 1058-1062 (1971)
93) W. Basuki, M. Iizuka, K. Furuichi, N. Minamiura, T. komaki, T. Yamamoto; Comparison of the enzymatic isomerization of glucose produced by porcine serum α-glucosidase and *Rhizopus* glucoamylase., *Agric. Biol. Chem.*, 53, 3341-3342 (1989)
94) 木村淳夫，千葉誠哉；Glucoamylaseおよびα-glucosidaseの示す縮合反応の速度論的解析．，第１３回糖質シンポジウム要旨集，pp. 127-128 (1991)
95) 奥田潤，田口忠緒：D-グルコースα－およびβ－アノマーとそのアルデヒド型の生理化学．，化学と生物，26，364-373 (1988)

96) H. Chiba, M. Ueda, and M. Hirose; Purification and properties of beef liver phosphoglucomutase., *Agric. Biol. Chem.*, 40, 2423-2431 (1976)
97) L. R. Marechal and S. Goldemberg; Uridine diphosphate glucose-β-1,3-glucan β-3-glucosyltransferase from *Euglena gracilis.*, *J. Biol. Chem.*, 239, 3163-3167 (1964)
98) 日本生化学会（編）；続生化学実験講座5，免疫生化学研究法，東京化学同人，東京（1986）
99) J. A. Thoma, J. E. Spradin, and S. Dygert; Plant and animal amylases, in *The enzymes, 3rd edn.*, ed. by P. D. Boyer, Academic Press, New York (1971), vol. 5, pp. 115-189
100) G. Mihael; D-Glucose 6-phosphate and D-fructose 6-phosphate., in *Methods in enzymatic analysis, 2nd edn.*, ed. by H. U. Bergmyer, Academic Press, New York, (1974), vol. 4, pp. 191-198
101) 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)
102) W. E. Trevelyan, D. P. Procter and J. S. Harrison; Detection of sugars on paper chromatgraphy., *Nature*, 166, 444-445 (1950)
103) S. Hakomori; A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide., *J. Biol. Chem.*, 55, 205-208 (1964)
104) C. C. Sweely, R. Bentley, M. Makita, and W. W. Wells; Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances., *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 2497-2507 (1963)
105) 千葉英雄；ホスホグルコムターゼ．，蛋白質核酸酵素，22，1530-1531 (1977)
106) 谷口肇；セロビオースの生産技術．，日本農芸化学会誌，63，1133-1135 (1989)
107) 中村孝夫，沖山敦，原田努；固形製剤．，特開昭62-273921 (1987)
108) 藤川茂昭，岡崎昌子；キシロオリゴ糖の生産と応用．，月刊フードケミカル 1月号，63-68 (1989)
109) 東京大学農学部農芸化学教室（編）；実験農芸化学第三版，朝倉書店，東京 (1978)，下巻，pp. 120-123
110) C. Braun; Cellobiose., in *Organic synthesis*, ed. by. A. H. Blatt, Collective vol. 2, John Wiley and Sons, New York (1943), pp. 122-127
111) G. L. Miller; Cellodextrins., in *Methods in carbohydrate chemistry*, ed. by R. L. Whisler, Academic Press, New York (1963), vol. 3, pp. 134-139 (1963)
112) 佐々木堯，田中崇，貝沼圭二；セロオリゴ糖の簡易な調製法，日本食品工業学会誌，26，538-541 (1979)
113) R. E. Wing and S. N. Freer; Use of trifluoroacetic acid to prepare cellodextrins., *Carbohydr. polymers*, 4, 323-333 (1984)
114) A. N. Pereira, M. Mobedshahi, and M. R. Ladisch; Preparation of

cellodextrins, in *Methods in Enzymology*, ed. by W. A. Wood and S. T. Kellog, Academic Press, New York (1988), vol. 160, pp. 26-38
115) J. C. Sadana and R. V. Patil; 1,4-β-D-Glucan cellobiohydrolase from *Sclerotium relfsii.*, in *Methods in Enzymology*, ed. by W. A. Wood and S. T. Kellog, Academic Press, New York (1988), vol. 160, pp. 307-314
116) K. Ohmiya, S. Shimizu; Cellobiosidase from *Ruminococcus albus.*, in *Methods in Enzymology*, ed. by W. A. Wood and S. T. Kellog, Academic Press, New York (1988), vol. 160, pp. 391-398
117) T. M. Wood; Cellobiohydrolase from *Penicillium pinophilum.*, in *Methods in Enzymology*, ed. by W. A. Wood and S. T. Kellog, Academic Press, New York (1988), vol. 160, pp. 398-403
118) T. Kanda and K. Nishizawa; Exocellulase of *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*)., in *Methods in Enzymology*, ed. by W. A. Wood and S. T. Kellog, Academic Press, New York (1988), vol. 160, pp. 403-408
119) K. W. King; Endwise degradation of cellulose., in *Advances in enzymatic hydrolysis*, E. T. Reese ed., Pergamon Press, Oxford (1963), pp. 159-170
120) 把田雅彦, 柏木豊, 谷口肇, 佐々木堯；メンブランリアクターによるセロビオースの酵素的生成. , 昭和６２年度日本発酵工学会大会講演要旨集, p. 30 (1987)
121) W. Z. Hassid, M. Doudoroff, and H. A. Barker; Enzymatically synthesized cristalline sucrose., *J. Am. Chem. Soc.*, 66, 1416-1419 (1944)
122) N. Tsumura and T. Sato; Enzymatic conversion of D-glucose to D-fructose. Part VI. Properties of the enzyme from *Streptomyces phaeochromogenus.*, *Agric. Biol. Chem.*, 29, 1129-1134 (1965)
123) J. Thiem, A. Sievers, and H. Karl; Praparative Zugange zu Mannobiose und Laminaribiose., *J. Chromatogr.*, 130, 305-313 (1977)
124) V. C. Barry and J. E. McCormic; α-laminaribiose., in *Methods in Carbohydrate Chemistry*, ed. by R. L. Whisler, Academic Press, New York (1962), vol. 1, pp. 328-330
125) S. Kusama, I. Kusakabe, M. Zama, K. Murakami, and T. Yasui; Studies on the β-1,3-glucanase system of *Streptomyces*. Part I. Enzymatic preparation of crystalline laminaribiose from curdlan., *Agric. Biol. Chem.*, 48, 1433-1440 (1984)
126) T. G. Villa and H. J. Phaff; A method for preparing laminaribiose by using yeast endo-(1,3)-β-D-glucanase., *Carbohydr. Res.*, 74, 369-370 (1979)
127) L.-X. Wang, N. Sakairi, H. Kuzuhara; Peracetylated laminaribiose: preparation by specific degradation of curdlan and its chemical conversion into *N*-acetylhyalobiuronic acid., *Carbohydr. Res.*, 219, 133-148 (1991)
128) T. Harada; The story of research into curdlan and the bacteria producing it., *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, 4, 309-317 (1992)

129) 松崎啓，大野尚仁；糖鎖の抗腫瘍活性．，糖質エンジニアリングと製品化技術，畑中研一　石原一彦（編），サイエンスフォーラム，東京（1993），pp. 161-178
130) 瓜生敏之，畑中研一；糖鎖の抗腫瘍活性．，糖質エンジニアリングと製品化技術．畑中研一　石原一彦（編），サイエンスフォーラム，東京（1993），pp. 179-199
131) T. Uryu, N. Ikushima, K. Katsuraya, T. Shoji, N. Takahashi, T. Yoshida, K. Kanno, T. Murakami, H. Nakashima, and N. Yamamoto; Sulfated alkyl oligosaccharides with potent inhibitory effects on human immunodeficiency virus infection., *Biochem. Pharmacol.*, 43, 2385-2392 (1992)
132) W. J. Whelan; Laminaridextrins., in *Methods in Carbohydrate Chemistry*, ed. by R. L. Whisler, Academic Press, New York (1962), vol. 1, pp. 330-333
133) W. D. Storvick and K. W. King; Complexity and mode of action of the cellulase system of *Cellvibrio gilvus.*, *J. Biol. Chem.*, 235, 303-307 (1960)
134) Y. Kashiwagi, C. Iijima, T. Sasaki, and H. Taniguchi; Characterization of a β-glucisidase encoded by a gene from *Cellvibrio gilvus.*, *Agric Biol. Chem.*, 55, 2553-2559 (1991)
135) Y. Kashiwagi, C. Aoyagi, T. Sasaki, and H. Taniguchi; The nucleotide sequence of the β-glucosidase gene from *Cellvibrio gilvus.*, *J. Ferment. Bioeng.*, 75, 159-165 (1993)
136) K. Haga, M. Kitaoka, Y. Kashiwagi, T. Sasaki, and H. Taniguchi; Purification and properties of a xylanase from *Cellvibrio gilvus* that hydrolyzes *p*-nitrophenyl cellooligosaccharides., *Agric. Biol. Chem.*, 55, 1959-1967 (1991)
137) H. J. Gilbert, D. A. Sullivan, G. Jenkins, L. E. Kellett, N. P. Minton, and J. Hall; Molecular cloning of maltiple xylanase genes from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa.*, *J. Gen. Microbiol.*, 134, 3239-3247 (1988)
138) E. Luthi, N. B. Jasmat, and P. L. Bergquist; Xylanase from the extremely thermophilic bacterium "*Caldocellum saccharolytium*": overexpression of the gene in *Escherichia coli* and characterization of the gene product., *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 2677-2683 (1990)
139) O. Grepinet, M.-C. Chebrou, and P. Beguin; Purification of *Clostridium thermocellum* xylanase Z expressed in *Escherichia coli* and identification of the cprresponding product in the culture medium of *C. thermocellum.*, *J. Bacteriol.*, 170, 4576-4581 (1988)
140) 日下部功，川口政良，安井恒男，小林達吉；菌体外放線菌キシラナーゼの精製とその諸性質について．，日本農芸化学会誌，51，429-437 (1977)
141) T. Yasui, M. Marui, I. Kusakabe, and K. Nakanishi; Xylanase of *Streptomyces.*, in *Methods in Enzymology*, ed. by W. A. Wood and S. T. Kellog, Academic Press, New York (1988), vol. 160, pp. 648-654

142) 山田英明，谷口肇，佐々木堯；*Aspergillus japonicus*の生産するキシラナーゼの精製と性質，1990年度日本農芸化学会大会講演要旨集，3Ap17 (1990)
143) H. Koyama, M. Ujiie, H. Taniguchi, and T. Sasaki; Purification and some properties of xylan-hydrolysing enzymes from *Robillarda* sp. Y-20., *Enzyme Microb. Technol.*, 12, 218-224 (1990)
144) M. L. Wolfrom and A. Thompson; Acetylation., in *Methods in Carbohydrate Chemistry*, ed. by R. L. Whisler, Academic Press, New York (1963), vol. 2, pp. 211-215
145) R. U. Lemieux; Tetra-*O*-acetyl-α-D-glucopyramosyl bromide., in *Methods in Carbohydrate Chemistry*, ed. by R. L. Whisler, Academic Press, New York (1963), vol. 2, pp. 221-222
146) J. Conchie and G. A. Levvy; Aryl glycopyranosides by the Koenigs-Knorr method., in *Methods in Carbohydrate Chemistry*, ed. by R. L. Whisler, Academic Press, New York (1963), vol. 2, pp. 335-337
147) A. Thompson and M. L. Wolfrom; Deacetylation., in *Methods in Carbohydrate Chemistry*, ed. by R. L. Whisler, Academic Press, New York (1963), vol. 2, pp. 215-220
148) N. R. Gilkes, M. Claeyssens, R. Aebersold, B. Henrissat, A. Meinke, H. D. Morrison, D. G. Kilburn, R. A. J. Warren, and R. C. Miller Jr.; Structural and functional relationships in two families of β-1,4-glycanases., *Eur. J. Biochem.*, 202, 367-377 (1991)
149) N. R. Gilkes, M. L. Langsford, D. G. Kilburn, R. C. Miller Jr., and R. A. J. Warren; Mode of action and substrarte specificities of cellulases from cloned bacterial genes., *J. Biol. Chem.*, 259, 10455-10459 (1984)
150) B. Henrissat, M. Claeyssens, P. Tomme, L. Lemesle, and J.-P. Mornon; Cellulase families revealed by hydrophobic cluster analysis., *Gene*, 81, 83-95 (1989)
151) N. R. Gilkes, B. Henrissat, D. G. Kilburn, R. C. Miller Jr., and R. A. J. Warren; Domains in microbial β-1,4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families., *Microbiol. Rev.*, 55, 303-315 (1991)
152) L. E. Kellett, D. M. Poole, L. M. A. Ferreira, A. J. Durrant, G. P. Hazlewood, and H. J. Gilbert; Xylanase B and an arabinofuranosidase from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa* contain identical cellulose-binding domains and are encoded by adjacent genes., *Biochem. J.*, 272, 369-376 (1990)
153) E. Luthi, D. R. Love, J. McAnulty, C. Wallace, P. A. Caughey, D. Saul, and P. L. Bergquist; Cloning, sequence analysis, and expression of genes encoding xylan-degrading enzymes from the thermophile "*Caldocellum saccharolytium*"., *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1017-1024 (1990)
154) O. Grepient, M.-C. Chebrou, and P. Beguin; Nucleotide sequence and deletion analysis of the xylanase gene (*XynZ*) of *Clostridium thermocellum*., *J. Bacteriol.*, 170, 4582-4588 (1988)

155) M. Kitaoka, T. Sasaki, and H. Taniguchi; Phosphorolytic reaction of *Cellvibrio gilvus* cellobiose phosphorylase., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 652-655 (1992)
156) M. Kitaoka, T. Sasaki, and H. Taniguchi; Synthetic reaction of *Cellvibrio gilvus* cellobiose phosphorylase., *J. Biochem. (Tokyo)*, 112, 40-44 (1992)
157) M. Kitaoka, S. Ogawa, and H. Taniguchi; A cellobiose phosphorylase from *Cellvibrio gilvus* recognizes only the β-D-form of 5a-carba-glucopyranose., *Carbohydr. Res.*, in press (1993)
158) M. Kitaoka, T. Sasaki, and H. Taniguchi; Purification and properties of laminaribiose phosphorylase (EC 2.4.1.31) from *Euglena gracilis* Z., *Arch. Biochem. Biophys.*, in press (1993)
159) M. Kitaoka, H. Taniguchi, and T. Sasaki; Production of glucosyl-xylose using *Cellvibrio gilvus* cells and its properties., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34, 178-182 (1990)
160) M. Kitaoka, T. Sasaki, and H. Taniguchi; Conversion of sucrose into cellobiose using sucrose phosphorylase, xylose isomerase and cellobiose phosphorylase., *Denpun Kagaku*, 39, 281-283 (1992)
161) M. Kitaoka, T. Sasaki, and H. Taniguchi; Conversion of sucrose into laminaribiose using sucrose phosphorylase, xylose isomerase and laminaribiose phosphorylase., *Denpun Kagaku*, 40, 311-314 (1993)
162) M. Kitaoka, T. Sasaki, and H. Taniguchi; Synthesis of Laminarioligosaccharides using crude extract of *Euglena gracilis* Z cells., *Agric. Biol. Chem.*, 55, 1431-1432 (1991)
163) M. Kitaoka, K. Haga, Y. Kashiwagi, T. Sasaki, H. Taniguchi, and I. Kusakabe; Kinetic studies on *p*-nitrophenyl-cellobioside hydrolyzing xylanase from *Cellvibrio gilvus*., submitted to *Biosci. Biotech. Biochem.*, Oct. 1992

謝辞

本論文は著者が農林水産省食品総合研究所素材化技術研究室および日本石油化学株式会社筑波研究室において行った研究をまとめたものである。本研究の軌跡を振り返ってみると実に多くの方々のご指導ご鞭撻により本論文が完成できたことが感じられる。

著者は、1986年4月に日本石油化学株式会社開発部より農林水産省食品総合研究所素材化技術研究室への派遣の機会を与えられ、本研究に着手することになった。当時の食品総合研究所素材化技術研究室長（現企画連絡室長）佐々木堯博士にはセロビオースホスホリラーゼに関する研究をテーマとして選定して頂くと共に、バイオテクノロジーに対して知識も経験もなかった著者に対して貴重なご指導，ご助言を頂いた。また後に素材化技術研究室長として来られた谷口肇博士（現岩手県醸造食品試験場長）には、研究の進め方から投稿論文の作成，国内外での学会発表の指導，最終的には本論文の構成に至るまで研究全般に対して、また公私ともに懇切丁寧なご指導を頂いた。本論文は両先生のご指導なくしては完成を見ることはなかったと思われ、感謝の意に絶えない。素材化技術研究室の柏木豊先生および馬替由美博士には数多くのご指導およびご助言を頂いた。素材化技術研究室に研修生として来られた多くの方々にも研究に対する貴重なご意見を賜った。この場にて謝意を申し上げたい。

研究を進めるに当たって特に以下の方々にご指導を頂いた。慶應義塾大学理工学部応用化学科小川誠一郎教授には疑似糖を供与して頂くと共に疑似糖を用いた研究に関するご指導を頂いた。筑波大学農林学系日下部功教授には*S. olivaceoviridis* E-86のキシラナーゼを頂くと共にキシラナーゼの研究についてご助言を頂いた。素材化技術研究室の羽賀敬子先生（現筑波大），山田英明氏（日清製粉株式会社），村上隆之氏（山崎製パン株式会社）には精製酵素を提供して頂いた。食品総合研究所石田信昭博士，日本石油株式会社中央技術研究所斉藤恒夫氏にはＮＭＲの測定をして頂いた。ここには名前を出せなかった本研究に関わった方々も含め、ここに深く感謝の意を表するものである。

食品総合研究所派遣に当たり日本石油化学株式会社の関係者にご尽力を頂いた。食品総合研究所に派遣することにより研究を始めるきっかけを与えて下さった元

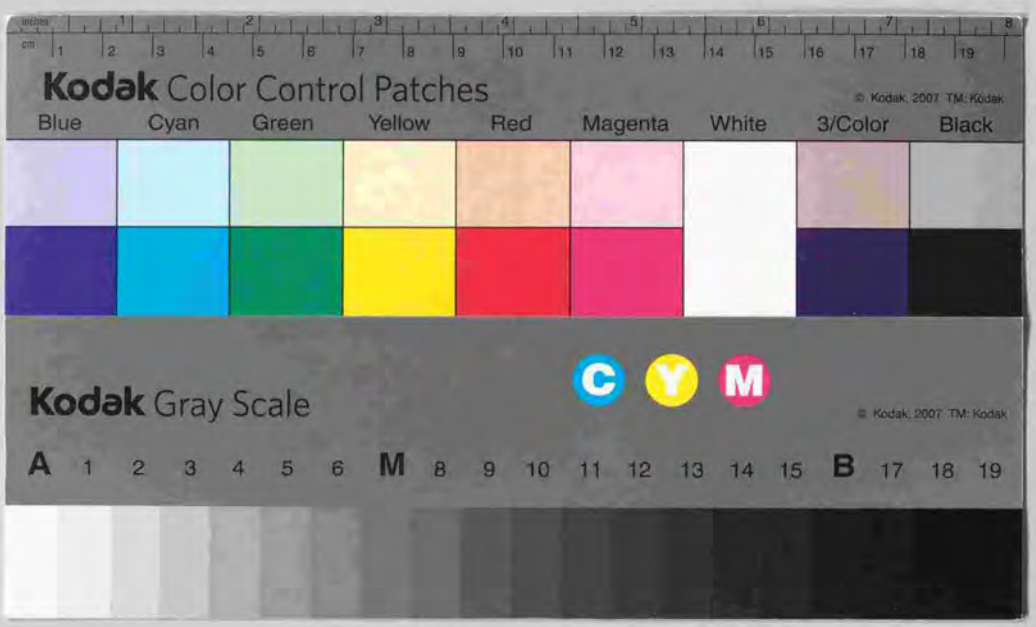
常務取締役馬替泰氏，元常務取締役堀江達雄氏，元開発部主管部員川上敞氏，派遣中の面倒を見て頂いた元取締役開発部長粟根信光氏，元開発部副部長古山堯氏，特に直属上司として何かと研究上の便宜を図って下さった開発部主管部員石倉功氏に深謝いたしたい。

本論文の作成に当たっては構成から事務手続きに至るまで、東京大学農学部太田隆久教授のご指導を頂き、感謝の念に堪えない。

以上のように数多くの方々のご協力をもって本論文をまとめあげることができた。ここまで約6年間継続して行ってきた研究をまとめて論文を作成できたことは著者にとって貴重な体験となった。この経験を今後の活動に生かせるようさらに精進する所存である。

平成5年8月20日

北　岡　　本　光


Kodak Color Control Patches
© Kodak, 2007 TM: Kodak
Blue
Cyan
Green
Yellow
Red
Magenta
White
3/Color
Black
Kodak Gray Scale
C
Y
M
© Kodak, 2007 TM: Kodak
A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19